Beyer

Handbuch der Mikroskopie



Handbuch der Mikroskopie

Beyer

Handbuch der Mikroskopie

Herausgeber:
Dr. rer. nat. Hermann Beyer

Wissenschaftlicher Mitarbeiter
im VEB Carl Zeiss JENA

2., stark bearbeitete Auflage
mit 493 Bildern und 45 Tafeln





VEB VERLAG TECHNIK BERLIN

Autorenverzeichnis

Ing. *Joachim Bergner*,
Laborgruppenleiter im VEB Carl Zeiss JENA, Nationalpreisträger
(Abschnitte 5., 6.1.9.8., 6.2.4., 6.2.5., 6.2.7.8.)

Dr.-Ing. *Reinhard Bernst*,
Wissenschaftlicher Abteilungsleiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschn. 6.2.7.)

Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*,
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschnitte 1., 3., 6.1.1., 6.1.2., 6.1.3., 6.1.8., 6.2.2., 6.2.3., 7., 11.)

Dipl.-Phys. *Gerhard Börner*,
Wislenschaftlicher Mitardeiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschn. 6.1.5.)

Dr. rer. nat. *Hans Gause*,
Ehem. Wissenschaftlicher Mitarbeiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschn. 6.1.4.)

Dipl.-Phys. *Bernhard Gröbler*,
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschnitte 9., 11.)

Dipl.-Phys. *Manfred Neupert*,
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschn. 10.)

Wolfgang Oettel,
Ehem. Wissenschaftlicher Mitarbeiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschnitte 6.2.1., 6.2.6.)

Dr. rer. nat. *Ludwig Otto*,
Wissenschaftlicher Mitarbeiter im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschnitte 6.1.1., 6.1.5., 6.1.9.)

Dr. rer. nat. *Horst Riesenberg*,
Wissenschaftlicher Abteilungsleiter im VEB Carl Zeiss JENA, Nationalpreisträger
(Abschnitte 2., 6.1.6., 6.1.7.)

Ing. *Friedrich Schüller*,
Konstruktionsgruppenleiter im VEB Carl Zeiss JENA, Nationalpreisträger
(Abschn. 4.)

Gerhard Weidel,
Ehem. Laboringenieur im VEB Carl Zeiss JENA
(Abschn. 8.)

Bearbeitete Auflage:

Lizenz 201. 370/15/77
DK 535.82 und 578.6. LSV 3575. VT 1/4085–2
Lektor: Ing. *Lutz Wagner*
Schutzumschlag: *Kurt Beckert*
Einband: *Kurt Hoppe*
Typografie: *Horst Bünger* und *Kurt Hoppe*
Printed in the German Democratic Republic
Gesamtherstellung: Offizin Andersen Nexö, Graphischer Großbetrieb, Leipzig
Bestellnummer: 5524377
DDR 48,50 M

Geleitwort

Ein Kollektiv namhafter Wissenschaftler des VEB Carl Zeiss JENA unter der Anleitung von Dr. *Hermann Beyer* hat eine Aufgabe erfüllt, deren Auswirkung praktisch allen Gebieten der Forschung, Technik, Medizin, Biologie und vielen weiteren Disziplinen zugute kommt, sie vollendeten ein „Handbuch der Mikroskopie". Es ist eine Konsequenz, die mit der Geschichte des Zeiss-Werkes gekoppelt ist, daß gerade in diesem größten Betrieb des wissenschaftlichen Gerätebaus der Gedanke, der modernen Forschung und Technik ein fundamentales Werk – wie es dieses „Handbuch der Mikroskopie" darstellt – in die Hand zu geben, zwangsläufig entstehen mußte. Alle Mitarbeiter an diesem Handbuch stehen mittendrin im Gedankenkreis des neuzeitlichen technischen Geschehens, sie sind Mitgestalter des Neuen, aber auch Kenner der Werksgeschichte, die mit den Namen Zeiß und Abbe engstens verbunden ist.

Es hat sich in den letzten Jahren erwiesen, daß die Lichtmikroskopie trotz starken Anwachsens scheinbar konkurrierender Gebiete, wie das der Elektronenmikroskopie oder der Röntgenstrahlenmikroskopie, kontinuierlich an Bedeutung zunimmt. Nicht nur, daß sich die Lichtmikroskopie, zu einer Mikroskopie aller Wellenlängen ausweitend, für das UV- sowie IR-Gebiet unentbehrlich gemacht hat, es entwickelt sich die Tendenz, quantitative Ermittlung physikalisch-optischer Meßgrößen an mikroskopischen Objekten vornehmen zu können. Somit ist die Mikroskopie ein typisches Beispiel für die Disziplin „Wissenschaftlicher Gerätebau" geworden. Die Forderung der modernen Forschung und Technik richtet sich auf Geräte, die ein mikroskopisches Zählen, Messen und Vergleichen gestatten. Die Kopplung der Mikroskope mit modernen Registriereinrichtungen wurde deshalb bereits zur Selbstverständlichkeit für den Gerätehersteller. Weiterhin treten Gesichtspunkte der Automatisierung in den Vordergrund. Damit wurde das Mikroskop in seiner bisher höchsten Stufe zu einem optisch-feinmechanisch-elektronisch-automatisierten Gerät, wobei die Tendenz im Vordergrund steht, eine Typisierung der gesamten Mikroskopanordnungen weitgehend durchzuführen (vgl. MIKROVAL). Mit diesen Entwicklungen auf mikroskopischem Gebiet ist das von vielen Zweigen, etwa dem der kernphysikalischen Meßtechnik, geforderte Erreichen der höchsten Genauigkeit gekoppelt. Die moderne Physik gibt starke Impulse zu neuartigen Möglichkeiten für die Mikroskopie, wobei besonders an die Kombination von Lasern mit Mikroskopen und fotografischen Einrichtungen gedacht sei. Die Forderung der Mediziner und Biologen nach Möglichkeiten zum Messen von Strukturveränderungen in Zellen, zum Verfolgen der Mikrokoagulation und anderer wichtiger Vorgänge ist damit erfüllbar.

Der Zweck der Herausgabe des Werkes „Handbuch der Mikroskopie" dürfte durch die kurzen angestellten Betrachtungen hinreichend klargestellt sein. Es soll den Stand der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Mikroskopie veranschaulichen. Dies ist aber nicht das einzige Anliegen. Der Gerätehersteller selbst muß darauf bedacht sein, auch auf dem Gebiet der Geräteapplikation maximal wirksam zu werden. Er muß planen, welche Richtungen als Vorlauf für neue mikroskopische Anordnungen eingeschlagen werden müssen, um das Ziel, die Wissenschaft zur Produktivkraft werden zu lassen, in kürzester Zeit erreichen zu können.

Der Inhalt des Handbuches soll den Leser als Anwender der Mikroskopie zum Nachdenken veranlassen, welche weiteren Forderungen an den Gerätehersteller zu stellen sind.

Unter all diesen Aspekten betrachtet, sollte dem „Handbuch der Mikroskopie" ein voller Erfolg beschieden sein!

Prof. Dr. Dr. h.c. *Paul Görlich*
Nationalpreisträger

Vorwort

Zur 2. Auflage

Die 1. Auflage des Handbuchs war schon kurz nach ihrem Erscheinen vergriffen. Daraus läßt sich schließen, daß ein echter Bedarf vorlag und sowohl Inhalt als auch Gestaltung überwiegend positiv beurteilt wurden. Autoren und Herausgeber haben deshalb den Vorschlag des Verlages begrüßt, eine 2. Auflage des Handbuchs der Mikroskopie herauszubringen, und gern die dafür notwendige Überarbeitung übernommen. Wir sind uns darüber im klaren, daß an der 1. Auflage trotzdem noch manches verbesserungsbedürftig war und bei einer Neuauflage außerdem der jüngsten Entwicklung auf dem Gebiet der angewandten Mikroskopie Rechnung getragen werden muß. Wir danken den Kritikern für wertvolle Anregungen, die im angemessenen Rahmen berücksichtigt worden sind.

Zunächst wurden alle inzwischen erkannten Druckfehler und kleinen Unstimmigkeiten ausgemerzt und durch zweckmäßigere Anordnung insbesondere des auf den neuesten Stand gebrachten Literatur- und Sachwörterverzeichnisses die Übersichtlichkeit erhöht. Damit wird, wie auch durch die zweispaltige Textanordnung, der Charakter des Handbuches als Nachschlagewerk noch stärker betont.

Da der Gesamtumfang des Buches nicht erweitert werden sollte, war es notwendig, den Text zu straffen und einzelne Abschnitte zu kürzen, um für die Aufnahme der in der Zwischenzeit entwickelten neuen mikroskopischen Geräte und Verfahren Platz zu schaffen. So hat z. B. Abschnitt 9. über Messen und Zählen durch eine etwas ausführlichere Behandlung der automatischen Bildanalyse eine wesentliche Erweiterung erfahren, und der Abschn. 6.1.5. über Fluoreszenzmikroskopie wurde gründlich überarbeitet. Die im Vorwort zur 1. Auflage formulierte Zielstellung sollte dabei unbedingt erhalten bleiben.

Wir hoffen, daß die Herausgabe der 2. Auflage dem „Handbuch der Mikroskopie“ die alten Freunde erhalten und neue erobern wird.

Zur 1. Auflage

Das Mikroskop hat mit der Entwicklung von Wissenschaft und Technik ständig an Bedeutung gewonnen. Es wird heute nicht nur für Forschungsarbeiten, sondern in immer stärkerem Maße auch für Routineuntersuchungen eingesetzt. Viele naturwissenschaftliche und technische Arbeitsrichtungen bedienen sich des Mikroskops. In den meisten Fällen genügt es nicht mehr, sich durch Betrachten und Vergleichen mikroskopischer Bilder ein Urteil über die Eigenschaften des untersuchten toten oder lebenden Materials zu bilden. Das Mikroskop hat sich immer mehr von einem Beobachtungs- zu einem Meßinstrument entwickelt. Dabei handelt es sich nicht nur um Längenmessungen in den drei Dimensionen, sondern in steigendem Maße um die Bestimmung von Materialeigenschaften der mikroskopischen Objekte, z. B. Absorptions- bzw. Reflexionsvermögen, Lichtbrechung und Doppelbrechung, Fluoreszenzeigenschaften, Temperaturverhalten und Mikrohärte. Da verallgemeinerungsfähige gesicherte Aussagen nur aus einer Vielzahl solcher an verschiedenen Individuen durchgeführten Einzelmessungen gewonnen werden können, ist meist ein umfangreiches Meßprogramm zu absolvieren, das zu einer weitgehenden Rationalisierung drängt.

Auch das inzwischen zum Routinegerät entwickelte Elektronenmikroskop kann die Bedeutung des Lichtmikroskops in keiner Weise herabsetzen. Es ist zwar dem letzteren hinsichtlich des Auflösungsvermögens eindeutig überlegen, erfordert aber eine aufwendige Präparation, die leicht zu Artefakten führt und eine Lebendbeobachtung ausschließt. Es ist deshalb dem Lichtmikroskop innerhalb der durch dieses festgelegten Auflösungsgrenze deutlich unterlegen. Da außerdem die Elektronenmikroskopie in den meisten Fällen die Kombination mit der Lichtmikroskopie erfordert und bei der Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate Lichtmikroskope eingesetzt werden müssen, ist mit der Weiterentwicklung

des Elektronenmikroskops auch eine verstärkte Anwendung des Lichtmikroskops zu erwarten.
Um die dem praktischen Mikroskopiker mit den modernen Mikroskopen und ihren Einrichtungen gebotenen vielfältigen Möglichkeiten optimal ausnutzen zu können, müssen diese zunächst bekannt sein, und man muß wissen, unter welchen Bedingungen die theoretisch vorgegebene Leistungsgrenze des Mikroskops auch praktisch erreicht werden kann. Die wichtigste Aufgabe dieses Handbuches soll es deshalb sein, diese Grundkenntnisse zu vermitteln. Das Hauptgewicht wird dabei auf die Mikroskopierverfahren und ihre Anwendungen gelegt, damit der Mikroskopiker das Buch wirklich als Nachschlagewerk für seine praktische Arbeit benutzen kann. Es soll aber andererseits auch nicht nur ein Rezeptbuch sein, d. h., es muß so viel von der Theorie enthalten, daß der aufmerksame Leser in der Lage ist, die bei den einzelnen Mikroskopierverfahren erforderlichen Maßnahmen wenigstens in groben Zügen zu verstehen. Auf die Elektronenmikroskopie wird dabei nicht näher eingegangen, da das den Rahmen des Buches sprengen würde.
Ein umfangreiches Literatur-, Sachwörter- und Namensverzeichnis sollen das Auffinden der einschlägigen Literatur, der auftretenden wichtigsten Begriffe und der Namen der Mikroskopiker, die zu den behandelten Problemen einen erwähnenswerten Beitrag geleistet haben, erleichtern.
Die Mitarbeiter an diesem Handbuch haben sich in ihren Beiträgen bemüht, eine Darstellung zu finden, daß der aufmerksame Leser ohne Spezialkenntnisse dem Gedankengang folgen kann. Das Buch soll als Nachschlagewerk verwendbar sein, das den Leser in die Lage versetzt, für die von ihm zu lösenden Probleme die günstigste Ausrüstung auswählen und ihr Leistungsvermögen voll ausschöpfen zu können. In welchem Maße das gelungen ist, muß dem Urteil des Lesers überlassen bleiben. Für kritische Bemerkungen und weitere Hinweise fühlen wir uns zu Dank verpflichtet.

Der Herausgeber

Inhaltsverzeichnis

1. Historischer Rückblick

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

1.1. Einleitung [1] bis [8]

Das Mikroskop hat sich in seiner fast 400jährigen Geschichte von einem optischen Vergrößerungsgerät für Liebhaber zu einem Forschungsinstrument entwickelt, das heute in Wissenschaft und Technik einen wichtigen Platz einnimmt. Besondere Verbreitung hat es in der Biologie und Medizin gefunden, von wo es nicht mehr hinwegzudenken ist. Ist es doch erst mit Hilfe des Mikroskops möglich geworden, einen Blick in die Werkstatt des Lebens zu richten, die zunächst mehr oder weniger spekulativen Hypothesen über den Aufbau und die Funktion des tierischen und pflanzlichen Organismus durch eine wissenschaftlich begründete Theorie zu ersetzen und die tieferen Ursachen einer ganzen Reihe von Krankheiten, besonders der Infektionskrankheiten, zu erkennen, wodurch erst eine zielstrebige und wissenschaftliche Therapie eingeleitet werden konnte.
Doch auch im Bereich der technischen Wissenschaften hat sich das Mikroskop einen festen Platz erobert, um z. B. aufgrund von Gefügeuntersuchungen auf Werkstoffeigenschaften zu schließen oder um in der Mineralogie und Geologie eine wissenschaftliche Untersuchung und Erschließung von Lagerstätten und Bodenformationen durchführen zu können. Darüber hinaus gibt es noch eine ganze Anzahl von Anwendungsgebieten, in denen das Mikroskop eine wichtige Rolle spielt, wie in der Nahrungsmittelindustrie, der Textiltechnik, der Kernphysik zur Auswertung von Kernspuremulsionen, der Halbleitertechnik und als Arbeitshilfsmittel in verschiedenen Bereichen der optischen und feinmechanischen Industrie und der Elektroindustrie.
Es dürfte deshalb von allgemeinem Interesse sein, diesem Handbuch einen Abschnitt über die historische Entwicklung des Mikroskops und der Mikroskopie voranzustellen, um vor allem an die Persönlichkeiten zu erinnern, die als Wissenschaftler, Techniker oder Liebhaber einen hohen Anteil an der Entwicklung des Mikroskops haben, das die mit den heute zur Verfügung stehenden technischen Möglichkeiten erreichbare Leistungsgrenze im wesentlichen auch praktisch erreicht hat. Dieser Abschnitt soll aber auch zeigen, wie die Leistungsgrenze des Mikroskops, z. B. durch Verwendung neuer Gläser, spezieller Abbildungsverfahren oder Strahlung kürzerer Wellenlängen, immer weiter hinausgeschoben wurde. Auch heute sind noch solche Möglichkeiten vorauszusehen, deren Realisierung von der technischen Entwicklung abhängt. Es soll weiter gezeigt werden, wie wichtig die Zusammenarbeit der Gerätehersteller mit den Anwendern ist. Es braucht in diesem Zusammenhang nur an die Begründung der wissenschaftlichen Bakteriologie erinnert zu werden, die mit Namen, wie *Koch*, *Löffler*, *Pasteur* u. a., eng verbunden ist. Die Zeit war für eine solche Entwicklung erst reif, als die Mikroskope einen bestimmten Entwicklungsstand erreicht hatten. Die Begründung der Bakteriologie war nicht nur in wissenschaftlicher, sondern auch in sozialer Hinsicht von so großer Tragweite, daß es für die Mikroskophersteller keines weiteren Anstoßes bedurfte, um nach Möglichkeiten zum Verbessern der Leistung des Mikroskops zu suchen. Auch heute liegt die Haupttriebfeder für die Weiterentwicklung und Verbesserung des Mikroskops in einer solchen Zusammenarbeit.
Die Entwicklung des Mikroskops ist nicht gleichmäßig verlaufen, was nicht in erster Linie durch die technischen Möglichkeiten, sondern in höherem Maße durch die jeweilige geistige Situation begründet ist. Den Mikroskopherstellern fehlte in manchen Entwicklungsperioden zunächst der wissenschaftlich geschulte Partner, der in der Lage und gewillt war, die vielen Details der mikroskopischen Beobachtungen im Zusammenhang zu sehen und in die Zukunft weisende Forderungen für die Weiterentwicklung zu stellen.

1.2. Die ersten 150 Jahre der mikroskopischen Entwicklung

Es muß angenommen werden, daß schon im Altertum das Brechungsvermögen von Linsen und mit Wasser gefüllten Glaskugeln bekannt war. Doch erst aus der Zeit um das Jahr 1000 u. Z. ist schriftlich überliefert, daß der Araber *Alhazen* optische Versuche mit kleinen Glaskugelsegmenten durchgeführt hat. Dabei kann ihm kaum entgangen sein, daß diese bei richtiger Anwendung eine vergrößernde Wirkung ausüben. 1267 weist der englische Philosoph und Naturforscher *Roger Bacon* darauf hin, daß solche Kugelsegmente schwachsichtigen Personen als Vergrößerungsgläser dienen können. Damit war die Brille geboren, die dann auch bald als Sehhilfe in Gebrauch kam. Über die Verwendung stärker vergrößernder Linsen ist aus den darauffolgenden drei Jahrhunderten nichts bekannt geworden.

Über die Erfindung des Mikroskops lassen sich keine sicheren Aussagen machen. Nach schriftlicher Überlieferung durch den Arzt *Pierre Borel* sollen *Hans* und *Zacharias Jansen* (Vater und Sohn) aus Middelburg in Holland Anfang des 17. Jahrhunderts das Mikroskop erfunden haben. Sie werden gleichzeitig als Erfinder des Fernrohrs angesehen.

Zu dieser Zeit war die Entwicklung von Mikroskop und Fernrohr eng miteinander verflochten. So wird berichtet, daß *Galilei* das nach ihm benannte Fernrohr durch Vergrößern des Abstands zwischen Objektiv- und Okularlinse (es gab zu dieser Zeit noch keine zusammengesetzten optischen Einzelsysteme) auch für mikroskopische Beobachtungen benutzt hat. *Cornelius Jacobszoon Drebbel* (1572 bis 1634) aus Alkmaar wird ebenfalls als Erfinder des Mikroskops angesehen. Wenn das auch wahrscheinlich nicht zutrifft, so hat er sich doch um die Verbreitung des zusammengesetzten Mikroskops große Verdienste erworben. Er hat selbst, wahrscheinlich nach dem Jansenschen Vorbild, Mikroskope gebaut, bei denen die Vergrößerung durch Ändern der Tubuslänge variiert werden konnte.

Die „Academia dei Lincei“ (Luchsäugige) in Rom, der auch Galilei angehörte, benutzte das Mikroskop als Forschungsinstrument zuerst zu planmäßigen Studien. Ihre Mitglieder haben auch als erste den Namen „Mikroskop“ gebraucht. Aus dieser Zeit stammen die ersten wichtigen biologischen Entdeckungen, wie der Feinbau des Facettenauges der Biene durch *F. Stelluti*.

Neben dem aus zwei Linsen zusammengesetzten Mikroskop wurde schon in der ersten Hälfte des 17. Jahrhunderts das einfache Mikroskop benutzt, dessen Optik nur aus einer Linse bestand. Man würde es im gegenwärtigen Sprachgebrauch als Lupe bezeichnen. Es verdrängte zunächst das zusammengesetzte Mikroskop, weil es bei größerer Lichtstärke mit geringerer sphärischer Aberration behaftet war. *R. Descartes* hat in seiner „Dioptrique“ im Jahre 1637 ein solches Mikroskop beschrieben, das in seiner verbesserten Form zur Auflichtbeleuchtung mit einem großen Hohlspiegel versehen war, in dessen Scheitel sich die Objektivlinse und in der Nähe des Spiegelbrennpunkts das zu untersuchende Objekt befand. Es ist unter dem Namen „Megaloskop“ bekannt geworden.

Von den zahlreichen Mikroskopikern des 17. Jahrhunderts sollen nur einige hervorgehoben werden, die sich besondere Verdienste erworben haben.

An erster Stelle stand zu dieser Zeit Holland vor Italien und England. Von einer wissenschaftlichen Mikroskopie konnte jedoch, trotz einiger bedeutsamer Erfolge, damals noch kaum die Rede sein. Es handelte sich im wesentlichen um Untersuchungen von Amateuren, die die Mikroskopie aus Liebhaberei betrieben, viele Einzeluntersuchungen durchführten, doch, bis auf wenige Ausnahmen, eine straffe Systematik vermissen ließen.

Als einer der Erfolgreichsten ist *Leeuwenhoek* (1632 bis 1723) zu nennen, der mit selbstgebauten einfachen Mikroskopen für die damalige Zeit erstaunliche Entdeckungen machte, die auf eine sehr gute Qualität seiner Mikroskope schließen lassen. Er muß ein meisterhafter Linsenschleifer gewesen sein. Eine besonders kleine der von ihm nachgelassenen Linsen ermöglicht eine Vergrößerung bis zu 270fach, was einer Brennweite von etwa 1 mm entspricht. *Leeuwenhoek* entdeckte mit seinen Mikroskopen u. a. die Faserstruktur der Augenlinse, verschiedene Arten von Infusorien, die roten Blutkörperchen und die Bakterien. Er regte durch seine Arbeiten ganz erheblich zu weiteren Untersuchungen an.

In Italien begründete der Arzt und Naturforscher *M. Malpighi* (1628 bis 1694) die mikroskopische Anatomie. Er untersuchte den Bau verschiedener innerer Organe. Noch heute erinnern die „Malpighischen Körper“ und die von ihm entdeckten Exkretionsorgane der Insekten, die „Malpighischen Gefäße“, an diesen großen Forscher und Mikroskopiker.

Von den englischen Mikroskopikern dieser Zeit ist besonders *R. Hooke* zu erwähnen, der mit einem selbstgebauten zusammengesetzten Mikroskop den Aufbau der Pflanzen aus Zellen entdeckte, ohne jedoch Einzelheiten über die Funktion der Zelle zu erkennen. Er hat in seiner im Jahre 1665 in London erschienenen „Micrographia" [6] eines der von ihm benutzten Mikroskope und die damit durchgeführten Untersuchungen sehr ausführlich beschrieben. Nach den erhaltenen Ergebnissen zu urteilen, war das schon ein recht gutes Instrument. Zur Beleuchtung dienten ein mit Wasser gefüllter Glasballon und eine Kollektorlinse, über die das Licht eines Öllämpchens auf das Präparat gelenkt wurde. Der Tubus konnte zur Erhöhung der Lichtstärke mit Wasser gefüllt werden. Als stärkste Linse hat er, wie vor ihm schon *Torricelli*, eine kleine geschmolzene Glaskugel benutzt.

Etwa aus der gleichen Zeit sind *A. Kircher*, der schon 1646 eine Beschreibung verschiedener einfacher Mikroskope gegeben und erste mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt hat, *Divine* aus Rom, der durch feste Verbindung mehrerer Linsen zu einem System eine wesentliche Verbesserung des Mikroskops erreichte, und die Gebrüder *S. J.* und *J. J. van Muschenbroek* und der gleichnamige Sohn des letzteren zu nennen. Die Muschenbroeks haben wesentlich zur Verbesserung des einfachen Mikroskops beigetragen. Sie verwendeten Sätze auswechselbarer Linsen verschiedener Brennweite und führten auch einige mechanische Verbesserungen durch. Der holländische Arzt und Zoologe *J. Swammerdam* hat die mit einem Muschenbroekschen Mikroskop durchgeführten Untersuchungen in der „Bybel der Natuure" veröffentlicht. Weitere Verbesserungen gehen auf die Italiener *C. A. Tortona* und *F. Bonanni* sowie den Holländer *N. Hartsoeker* zurück. *Tortona* übertrug die damals beim einfachen Mikroskop schon übliche Durchlichtbeleuchtung auf das zusammengesetzte Mikroskop. *Bonanni* führte einen Beleuchtungsapparat auf der Basis der optischen Bank ein, während *Hartsoekers* einfaches Mikroskop aus zwei zusammenschraubbaren Röhren bestand. In einer derselben befanden sich die auswechselbare Objektivlinse und der Objektschieber in kupfernem Rahmen, in der anderen die Beleuchtungslinse. Fokussiert wurde durch ein Schraubgewinde am Rohr.

Einer der größten Gelehrten seiner Zeit, *Isaac Newton*, stellte im Jahre 1669 die Emanationstheorie des Lichts auf. Er nahm an, daß das Licht eine Teilchenstrahlung ist. Diesen Teilchen konnte er bestimmte Eigenschaften zuschreiben, um die damals bekannten Lichterscheinungen zu erklären. *Christian Huygens* stellte dem 1677 die Undulationstheorie entgegen, d. h., er betrachtete die Lichtausbreitung als Wellenbewegung. Beide Theorien konnten zunächst nicht endgültig bestätigt oder widerlegt werden, bis *Thomas Young* 1802 durch seine bekannten Interferenzversuche den Streit zugunsten der Wellentheorie entschied. *Malus* konnte 1808 durch seine Polarisationsuntersuchungen nachweisen, daß es sich bei der Wellenausbreitung des Lichts um transversale Wellen handelt. Doch die elektromagnetische Natur dieser Wellen ist erst 1871 von *Clark Maxwell* erkannt und beschrieben worden.

Nach dieser doch recht stürmischen Entwicklung des einfachen Mikroskops im 17. Jahrhundert trat im 18. Jahrhundert zunächst ein Stillstand der Mikroskopentwicklung ein. Man hatte im wesentlichen die mit den damals zur Verfügung stehenden Mitteln mögliche Leistungsgrenze erreicht. Die mit dem Mikroskop gemachten Entdeckungen wurden als Wunder der Natur bestaunt, konnten jedoch den Gang der Wissenschaft nicht in stärkerem Maße beeinflussen. So waren z. B. die Blutkörperchen, der Blutkreislauf, der Aufbau der Pflanzen aus Zellen und die Bakterien entdeckt, doch konnte daraus noch keine wissenschaftlich begründete Hämatologie, Physiologie, Zelltheorie und Bakteriologie abgeleitet werden. Hinzu kam die Meinung mancher maßgeblicher Wissenschaftler, daß man des Mikroskops nicht bedürfe, da es noch so vieles zu entdecken gäbe, was auch ohne Mikroskop zugänglich sei. In optischer Hinsicht fehlte vor allem die Möglichkeit, den sehr störenden Farbfehler zu beseitigen oder wesentlich zu mindern. Deshalb bezogen sich die in dieser Zeit durchgeführten Verbesserungen zunächst fast ausschließlich auf den mechanischen Aufbau und die Beleuchtung.

J. Marshall befestigt um 1700 Tubus und Tisch an einer kippbaren Säule, so daß die Einhaltung der optischen Achse auch bei Kippung des Stativs zum Schrägeinblick gesichert war. Diese Methode ist später von fast allen Mikroskopherstellern übernommen worden. Zur Durchlichtbeleuchtung verwendete er eine Kondensorlinse und *C. G. Hertel* erstmalig 1716 einen Planspiegel.

J. Wilson führte 1702 das Zirkelmikroskop ein. Das Stativ hatte zwei federnde Messingarme. An einem von ihnen befand sich die Objektivlinse und an dem anderen das Präparat, so daß beide mit einer Flügelschraube gegeneinander bewegt werden konnten und dadurch eine einfache Fo-

kussierung ermöglicht wurde. Das von ihm verbesserte einfache Mikroskop soll Vergrößerungen bis zu 400fach erreicht haben.
J.N.Lieberkühn führte 1738 den nach ihm benannten Hohlspiegel für die Auflichtbeleuchtung ein, wie ihn in ähnlicher Form 100 Jahre vorher schon *Descartes* verwendet hatte. Weitere mechanische Verbesserungen aus dieser Zeit stammen von *E.Culpeper*, *J.Cuff*, *G.Adams*, *J.Bleuler* u.a.

1.3. Einführung achromatischer optischer Systeme

Bis zur Mitte des 18. Jahrhunderts wurde, nicht zuletzt wegen der günstigeren sphärischen und chromatischen Korrektion, vorwiegend das einfache Mikroskop verwendet. Das änderte sich erst, nachdem die theoretischen Grundlagen der Achromatisierung erarbeitet und auch Möglichkeiten zu ihrer Realisierung gefunden waren.
D.Gregory konnte schon im Jahre 1695 zeigen, daß man den Farbfehler durch Kombination brechender Medien unterschiedlicher Dispersion vermindern kann. Er stand damit im Widerspruch zur größten Autorität seiner Zeit, zu *Isaac Newton*, der aufgrund unzureichender Versuche die Ansicht vertrat, daß der Bau achromatischer Linsensysteme unmöglich ist. *C.M.Hall* konstruierte 1733 erstmalig ein achromatisches Fernrohrsystem, das *J.Dollond* von 1758 ab serienmäßig herstellte.
Im Jahre 1771 gab der bekannte Mathematiker *L.Euler* eine strenge theoretische Begründung der Achromate und veranlaßte kurze Zeit darauf *N.Fueß*, ein achromatisches Objektiv zu berechnen. Er fand jedoch keinen Hersteller für das berechnete Objektiv.
Das erste achromatische Mikroskopobjektiv ist wahrscheinlich von *F.G.Beeldsnyder* (1735 bis 1808) gebaut worden. Er verwendete zwei bikonvexe Linsen aus Kronglas und dazwischen eine bikonkave Linse aus Flintglas.
Da zur achromatischen Korrektion die Kombination von Positiv- und Negativlinsen aus verschiedenen Glassorten erforderlich ist, müssen sich die Brechkräfte genügend stark unterscheiden, damit die resultierende Brechkraft möglichst groß, die Gesamtbrennweite also möglichst klein wird. Das ist nur zu erreichen, wenn die Dispersion der zu kombinierenden Gläser nicht der Brechzahl proportional und die Brechkraft der Einzellinsen möglichst groß ist. Bei starken Vergrößerungen werden somit sehr kleine Linsen erforderlich. Deshalb waren die ersten achromatischen Objektive für relativ kleine Vergrößerungen ausgelegt.
H. van Deijl hat es beim Schleifen sehr kleiner Linsen zu einer solchen Fertigkeit gebracht, daß es ihm 1807 gelang, achromatische Objektive von relativ guter Bildqualität herzustellen, mit denen er Vergrößerungen bis 170fach erreichte. Die etwa zu gleicher Zeit von *Domet* in Frankreich, *Tully* in England und *Amici* in Italien hergestellten Linsen fielen dagegen deutlich ab.
Eine neue Ära in der Entwicklung der technischen Optik ist durch *J. von Fraunhofer* (1787 bis 1826) eingeleitet worden. Er stellte umfangreiche Untersuchungen über die Eigenschaften des optischen Glases an und machte erfolgreiche Versuche, durch Änderung der Glaszusammensetzung die Teilzerstreuung der einzelnen Glassorten günstig zu beeinflussen. Durch die spektrale Zerlegung des Lichts und Festlegung von Wellenlängennormalen durch die „Fraunhoferschen Linien“ sowie durch die Messung der zugehörigen Brechzahlen schuf er die Grundlagen für die Vorausberechnung von Objektiven und Okularen.
Selligue ließ im Jahre 1824 von *J.-L.-V.* und *C.-L. Chevaliers*, Vater und Sohn, ein Mikroskop bauen, bei dem mehrere hintereinandergeschaltete Paare achromatischer Linsen verwendet wurden. Dabei haben sie später erstmalig mit Kanadabalsam verbundene Kittglieder verwendet. Es war schon von den Fernrohren her bekannt, daß man durch Kombination solcher achromatischer Linsenpaare eine wesentlich günstigere achromatische Korrektion als mit einem einzigen Paar erreichen kann. Doch muß er sich, wie *H.Boegehold* [4] bemerkt, über die Wirkung der von ihm verwendeten Kombination nicht restlos klar gewesen sein. Denn für ein Mikroskopobjektiv, das, im Gegensatz zum Fernrohrobjektiv, für kurze Objektweiten und relativ große Bildweiten korrigiert sein muß, sind für optimale Korrektion die Linsenpaare, also die Folge Kronglas–Flintglas, gegenüber dem Fernrohrobjektiv zu vertauschen. Da er die Linsenpaare jedoch falsch benutzt hat, wird er gegenüber dem Einzelpaar kaum eine Korrektionsverbesserung erreicht haben. Schon kurze Zeit später hat *Listing* darauf aufmerksam gemacht.
Durch Ausnutzung dieser Erkenntnis hat der in der Mikroskopentwicklung außerordentlich erfolgreiche Italiener *G.B.Amici* (1786 bis 1863) die Abbildungsqualität des Mikroskops wesentlich verbessert und damit die Grundlagen für bahn-

brechende Entdeckungen in Biologie und Medizin geliefert. Seine besonderen Verdienste bestehen in der Kombination achromatischer Linsenpaare verschiedener Brennweite zu einem festen, als eine Einheit korrigierten Objektiv mit Korrektion der Deckglasdicke. Seine Trockenobjektive mit halbkugelförmiger Frontlinse waren allen früheren Objektiven überlegen. Von ihm stammt auch die erste Wasserimmersion.
A. Ross führte im Jahre 1837 die Korrektionsfassung für unterschiedliche Deckglasdicken ein. Mit der Verbesserung der Objektive verliert das einfache Mikroskop an Bedeutung und wird schließlich nur noch für sehr schwache Vergrößerungen verwendet.
In diese Periode, die etwa die erste Hälfte des 19. Jahrhunderts umfaßt, fallen einige mit dem Mikroskop ermöglichte Entdeckungen in der Biologie und Medizin, die nicht nur auf diese Gebiete selbst revolutionierend wirkten, sondern rückwirkend auch der Mikroskopentwicklung neuen Auftrieb gaben. Das zeigt sich u. a. an der Gründung verschiedener neue Mikroskope herstellender Firmen, wie *G. Oberhäuser* in Paris, *S. Plößl* in Wien, *K. P. H. Pistor* und *F. W. Schiek* in Berlin, *Powell* and *Lealand* in England, *Carl Zeiss* in Jena und *Karl Kellner* in Wetzlar, dessen Firma später von *Ernst Leitz* übernommen wurde.

1.4. Wechselseitige Abhängigkeit von Zytologie, Histologie, Bakteriologie und der Mikroskopentwicklung im 19. Jahrhundert

Im Jahre 1808 kann *L. C. Treviranus* nachweisen, daß die Gefäße der Pflanzen aus Zellen hervorgehen, indem sich junge Zellen der Reihe nach anordnen und ihre Querwände auflösen.
Der Botaniker *Meyen* erkennt im Jahre 1830 die Zellen als Bausteine des Pflanzenkörpers und die niederen Pilze und Algen als einzellige Gebilde. 1834 beschreibt *K. Deutsch* die Knochenzellen und *Heule* 1837 das Darmepithel.
1838/39 begründen der Botaniker *M. J. Schleiden* und der Zoologe *T. Schwann* die Zellenlehre in der Botanik und Zoologie. Sie konnten mikroskopisch nachweisen, daß eine Übereinstimmung in Struktur und Wachstum von Tieren und Pflanzen besteht. Alle Lebewesen bauen sich aus Zellen auf, die als die niedrigste lebensfähige Einheit anzusehen sind. Sie erkennen auch die besondere Bedeutung des Zellkerns bei der Entwicklung der Zelle. Neben dem Zellkern stand nur noch die Zellmembran im Vordergrund des Interesses. Die Bedeutung des Zellplasmas wurde hingegen erst später erkannt.
Eine wichtige Erkenntnis in der Entwicklung des Mikroskops und mikroskopischer Untersuchungsmethoden war die in den fünfziger Jahren durch *R. Virchow* begründete Zellularpathologie. Auch für das Krankheitsgeschehen muß als Ausgangsbasis und im Mittelpunkt die Zelle stehen.
Schon 1847 hatte er in einem Artikel „Über die Reform der pathologischen und therapeutischen Anschauungen durch die mikroskopischen Untersuchungen" auf die Bedeutung des Mikroskops für die Medizin hingewiesen. Das Mikroskop bestimmt in der Folgezeit das medizinische Denken. Erst durch verstärkten Einsatz immer leistungsfähigerer Mikroskope ist die vor allem von ihm und seinen Schülern durchgeführte Entwicklung zur modernen Pathologie möglich geworden.
Bahnbrechend auf dem Gebiet der Histologie war im 19. Jahrhundert vor allem der Anatom und Zoologe *A. von Kölliker*, der als Kollege *Virchows* in Würzburg lehrte und sich vor allem mit der Erforschung des Gewebebaus befaßte. Von ihm stammen eine ganze Reihe wichtiger Entdeckungen, u. a. 1841, daß die Samenfäden Produkte des männlichen Organismus sind, 1871 die Beschreibung des histogenetischen Aufbaus eines ganzen Knochens, 1880 neue Erkenntnisse über den Aufbau der Lunge. Im Jahre 1889 erscheint von ihm das Handbuch der Gewebelehre des Menschen. Es gelingt ihm 1891 die erste isolierte Darstellung glatter Muskelfasern und der Beweis, daß diese einer einzigen umgewandelten Zelle entsprechen, sowie der Nachweis, daß ein Zusammenhang einer Nervenzelle mit einer markhaltigen Faser besteht.
Im Jahre 1874 werden von *R. Virchow* und *C. Golgi* und 1888 von *S. R. Cajal* richtungweisende Arbeiten zur Untersuchung des Zentralnervensystems durchgeführt.
Auch in der Embryologie hat sich das Mikroskop im 19. Jahrhundert große Verdienste erworben. Die Vorstellung, daß jedes Lebewesen aus einem Ei stammt, ist schon 1651 von dem englischen Arzt *W. Harvey* entwickelt worden. Obwohl *R. de Graaf* bereits 1672 die Eierstockbläschen (Graafsche Follikel), *J. Ham* 1677 die Spermatozoen entdeckte und *Spallanzani* sich von 1776 bis 1780 eingehend mit dem Befruchtungsproblem und der künstlichen Besamung von Fröschen und Hunden beschäftigte, konnte ein tieferes Verständnis für die Befruchtungs- und Entwicklungsvorgänge erst

mit den wesentlich verbesserten Mikroskopen erreicht werden.

P.L. Prevost und *J.B.A. Dumas* beschreiben 1824 erstmalig die Teilung des Eis. Im Jahre 1827 entdeckt *von Baer* das Säugetierei und untersucht den Furchungsvorgang. *Saint Georges* weist 1865 nach, daß es sich beim Spermatozoon um eine Zelle handelt. Im Anschluß daran beschäftigen sich eine ganze Reihe von Forschern mit der mikroskopischen Erschließung der Samenreifungs- und Befruchtungsvorgänge. *Bütschli* gelang 1873 erstmals an Eiern von Nematoden die einwandfreie Beobachtung der Verschmelzung mit dem Spermatozoon. *O. Hertwig* und *H. Fol* geben 1875 und 1876 eine genaue Beschreibung des Befruchtungsvorgangs beim Seestern und 1875 *E. Strasburger* sowie *Bütschli* 1876 eine Beschreibung der mitotischen Kernteilung. Die Längsspaltung der Chromosomen erklärt *van Beneden* 1873. Daß Spermium und Ei Zellen sind, von denen die eine Träger und Übertrager der männlichen, die andere der weiblichen Erbmasse ist, konnte erst durch das Mikroskop klargestellt werden.

Da das Phasenkontrastverfahren noch nicht bekannt war und die ungefärbten Präparate für eine eindeutige Aussage zu wenig Kontrast zeigten, gehörten die zu entwickelnden Präparations- und Färbemethoden zu einem äußerst wichtigen, vielfach entscheidenden Hilfsmittel der mikroskopischen Forschung. In diesem Teilgebiet der angewandten Mikroskopie ist ein erheblicher Aufwand betrieben worden, ehe sich ein durchschlagender Erfolg abzeichnete. Die chemische Industrie mußte dafür die geeigneten Färbemittel zur Verfügung stellen. Durch die Einführung spezieller Fixierungs-, Einbettungs- und Färbeverfahren ist eine wesentliche Verbesserung der mikroskopischen Technik erreicht worden.

Die wichtigsten Färbeverfahren wurden vor allem von *J. Gerlach*, *Böhmer*, *Fischer* und *P. Ehrlich* entwickelt, die in dieser Reihenfolge 1858 die Karmin-, 1865 Hämatoxilin-, 1875 Eosin- und Methylenblaufärbung zur selektiven Färbung von Bakterien und *Ehrlich* 1886 die Färbung lebenden Gewebes erstmalig anwendeten. *K. Weigert* (1882) und *C. Golgi* (1885) führten das Beizverfahren in der Histologie ein und konnten durch Verwendung von Silbersalzlösungen die Feinstruktur des Zentralnervensystems nachweisen.

Zur Einbettung werden von *E. Klebs* Paraffin, von *Duval* und *P. Schiefferdecker* das Celloidinverfahren sowie von *Clark* und *E. Reißner* Kanadabalsam verwendet.

Im Jahre 1856 entwickelt *Welcker* das von *Oschatz* erfundene, besonders für die Histologen so wichtige Mikrotom.

Die mikroskopische Entwicklung wurde außerdem entscheidend durch eine neue Arbeitsrichtung der angewandten Mikroskopie beeinflußt, die an Durchschlagskraft alle bisherigen übertraf. Sie begann mit der Erforschung und tieferen Durchdringung der Infektionskrankheiten und ihrer Ursachen und mündete in die Mikrobiologie. Die Forderung nach Verbesserung der Mikroskope wurde zu einer sozialen Notwendigkeit, wenn man mit der zunehmenden Zusammenballung von Menschen in Großstädten und Industriezentren Schritt halten und der damit zunehmenden Seuchengefahr Herr werden wollte; denn die Bakterien sind so klein, daß man nur bei höchster mikroskopischer Auflösung aussagekräftige Resultate erhält. Das Mikroskop bekam dadurch eine noch breitere Anwendungsbasis. Neben der verstärkten Anwendung in der Medizin, vor allem in Krankenhäusern und Kliniken, mußten umfangreiche Untersuchungen zur Einleitung wirksamer hygienischer Maßnahmen angestellt werden. Hinzu kamen Nahrungsmittel-, Wasser- und Abwasseruntersuchungen.

Der erste große Schritt zur modernen Mikrobiologie und ihrer praktischen Anwendung in der Medizin und Hygiene wurde durch den französischen Chemiker *L. Pasteur* (1822 bis 1895) getan, der als Ursache der Weinkrankheiten Mikroorganismen feststellte, die gärungshemmende Fermente absondern. Er konnte außerdem zeigen, daß die Umwandlung von Zucker in Milchsäure durch einen Gärungsprozeß stattfindet. Von weittragender Bedeutung war seine Entdeckung der Fäulnisbakterien und ihre Unschädlichmachung durch Erhitzen (Pasteurisieren). In diesem Zusammenhang konnte auch eindeutig die Urzeugung widerlegt werden. Wo keine Bakterien oder Bakterienkeime sind, können auch keine entstehen. Das ist die Grundlage für alle hygienischen Maßnahmen. Von weittragender Bedeutung sind auch seine Untersuchungen über die Wundkrankheiten, das Kindbettfieber, den Milzbrandbazillus und die Tollwut. Er führte die Schutzimpfung mit abgeschwächten Bakterien ein.

Der zweite große Schritt in dieser Richtung war dem deutschen Arzt *R. Koch* (1843 bis 1910) vorbehalten, der als der Begründer der wissenschaftlichen Bakteriologie angesehen werden kann. Er hat Bakterien auf festen künstlichen Nährböden kultiviert und unter natürlichen Bedingungen auf einem Heiztisch unter dem Mikroskop mehrere

Stunden beobachtet, um ihre Entwicklung und Vermehrung zu studieren.
Eine wesentliche Verbesserung des mikroskopischen Rüstzeugs erfolgte durch Einführung des auf *Kochs* Anregung entwickelten Abbeschen Beleuchtungsapparats und der homogenen Ölimmersion.
Im Jahre 1882 entdeckt er den Tuberkelbazillus und nach Ausarbeitung eines komplizierten Färbeverfahrens 1883 den Cholerabazillus. Die Malariaplasmodien als Erreger der Malaria waren schon 1880 von *A. Lavaran* entdeckt worden. Die Bedeutung des Mikroskops für die Malariatherapie beschreibt *Koch* wie folgt: „Um die Malaria sicher zu beseitigen, muß das Chinin dann gegeben werden, wenn die großen ringförmigen Parasiten im Blut erscheinen. Das ist nur mit dem Mikroskop mit Sicherheit festzustellen."
Durch *Kochs* Arbeiten wurden eine Reihe weiterer wichtiger Entdeckungen mit Hilfe des verbesserten Mikroskops angeregt.
Der norwegische Arzt *A. Hansen* erkennt 1880 den Lepraerreger und *K. Eberth* den Typhuserreger. *F. Löffler* entdeckt 1884 den Diphtheriebazillus und *A. Nicolaier* den Tetanuserreger. Im Jahre 1894 entdeckt *S. Kitasato*, ein Schüler *Kochs*, den Pestbazillus. Im gleichen Jahr erkennt der englische Militärarzt *D. Bruce* die Trypanosomen als Ursache der Schlafkrankheit.
Der Zoologe *F. R. Schaudinn* und der Dermatologe *E. Hoffmann* entdecken 1905 die Spirochaeta pallida als Erreger der Syphilis, und schließlich fand *Frosch* 1924 unter Verwendung ultravioletten Lichts die Erreger der Maul- und Klauenseuche.

1.5. Die letzten 100 Jahre der Mikroskopentwicklung [3] [4]

Am Anfang dieser Entwicklungsperiode, die sich mit der des vorigen Abschnitts überschneidet, stehen die Arbeiten *E. Abbes* zur Theorie der Bildentstehung im Mikroskop, worin eine absolute, von Objektivapertur und Lichtwellenlänge abhängige Leistungsgrenze der mikroskopischen Abbildung festgelegt wird, und die Arbeiten zur rechnerischen Vorausbestimmung der Wirkung eines abbildenden optischen Systems. Erst hierdurch wurde eine serienmäßige Fertigung hochleistungsfähiger Mikroskopobjektive ermöglicht. Damit war gleichzeitig eine wesentliche Steigerung ihrer optischen Leistung verbunden.
Nicht zufällig fallen die von *J. W. Stephenson* 1878 angeregte und von *Abbe* (1840 bis 1905) und *C. Zeiss* (1816 bis 1888) durchgeführte Entwicklung der homogenen Ölimmersion und die ersten Ansätze zur Schaffung der apochromatischen Objektive in diese Zeit des Aufschwungs der Zytologie und Bakteriologie, da nur mit solchen Objektiven die geforderte höchste Auflösung und Bildqualität erreichbar sind.
Voraussetzung für eine entscheidende Verbesserung des Korrektionszustands waren, neben der Verwendung besonderer Kristalle als optische Medien, die von *Abbe* geforderten neuartigen optischen Gläser, die nach langwierigen Versuchsreihen durch *O. Schott* (1851 bis 1935) zur Verfügung gestellt werden konnten.
Mit den von *Abbe* berechneten und seit 1886 von *Carl Zeiss* vertriebenen apochromatischen Objektiven, die nicht nur für zwei Farben, wie die Achromate, sondern für drei Farben des sichtbaren Spektrums korrigiert sind, war ein gewisser Abschluß in der Entwicklung der Mikroskopoptik erzielt worden. Man hatte die mit den damals zur Verfügung stehenden Hilfsmitteln theoretisch mögliche Auflösungsgrenze im wesentlichen auch praktisch erreicht und klar erkannt, daß die Objektivapertur nicht wesentlich erhöht werden kann, aber eine bemerkenswerte Steigerung der Auflösung zu erwarten ist, wenn man zur Abbildung eine Strahlung wesentlich kürzerer Wellenlänge verwendet, z.B. zunächst die ultraviolette Strahlung, später die Röntgen- und schließlich die Elektronenstrahlung.
Der erste Schritt in dieser Richtung wurde 1904 von *A. Köhler* durch Einführung der Ultraviolettmikroskopie in die mikroskopische Praxis getan, nachdem *Abbe* schon 1878 die Verwendung der UV-Strahlung für die mikroskopische Abbildung empfohlen hatte. Da normales Glas für die ultraviolette Strahlung nicht durchlässig ist, wurden für diesen Zweck von *M. von Rohr* schon 1902 Spezialobjektive aus geschmolzenem Quarz berechnet, die allerdings nur für eine Wellenlänge oder für einen sehr engen Wellenlängenbereich korrigiert werden können. Deshalb konnten es nur Monochromate sein, und zur Abbildung mußte monochromatische Strahlung verwendet werden. Diese wurde durch eine Funkenentladung in Verbindung mit einem geeigneten Monochromator erhalten. Mit der verwendeten Wellenlänge von etwa 260 nm besteht die Möglichkeit, das Auflösungsvermögen um den Faktor 2 zu erhöhen.
Besonders zu erwähnen wäre noch die Dunkelfeldmikroskopie, bei der ausschließlich durch das Objekt abgelenktes Licht in das Objektiv gelangt.

Die ersten mikroskopischen Untersuchungen sind alle im Dunkelfeld durchgeführt worden. Doch von der eigentlichen Dunkelfeldmikroskopie kann man erst sprechen, nachdem dafür geeignete Beleuchtungseinrichtungen geschaffen worden sind, die es erlauben, ein großes Objektfeld gleichmäßig und möglichst rotationssymmetrisch zu beleuchten und Streulicht weitgehend zu vermeiden, so daß die zu untersuchenden Objekte auf nahezu schwarzem Feld hell aufleuchten.

Ein Spezialfall der Dunkelfeldmikroskopie ist die Spaltultramikroskopie nach *H. Siedentopf* und *R. Zsigmondy*, bei der senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops ein intensiv beleuchteter Spalt in die Objektebene abgebildet wird. Auf diese Weise können winzig kleine Teilchen sichtbar gemacht werden, deren Linearausdehnung um Größenordnungen unter der Auflösungsgrenze liegt. Diese Methode hat seinerzeit der Kolloidchemie großen Auftrieb verliehen und der Mikroskopie den ersten Nobelpreis eingebracht.

Neben den bahnbrechenden Erfolgen in Biologie und Medizin hat das Mikroskop allmählich auch Eingang in die technischen Wissenschaften, wie Mineralogie, Geologie und Werkstoffkunde, gefunden.

Während die Doppelbrechung des Lichts durch *E. Bartholinus* seit 1669, also schon über 300 Jahre, bekannt ist, gehen die ersten genaueren, aus Experimenten abgeleiteten Vorstellungen der Polarisation des Lichts auf *E. L. Malus* (1775 bis 1812) zurück. *W. Nicol* gibt 1829 das nach ihm benannte Polarisationsprisma an, und 1834 baut *H. F. Talbot* das erste Polarisationsmikroskop, das von dem vielseitigen englischen Physikprofessor *D. Brewster* zur systematischen Untersuchung von Mineralien benutzt wurde.

Damit war eine neue mikroskopische Arbeitsrichtung geboren, die sich vorwiegend quantitativer Methoden bedient. Im Jahre 1849 untersuchte *Henry Clifton Sorby* Dünnschliffe von kalkigem Sandstein und *Oschatz* 1851 dünngeschliffene Platten von Mineralien.

Ferdinand Zirkel führt 1863 mikroskopische Gesteinsstudien durch. *A. des Cloizeaux* bestimmt kristalloptische Werte und empfiehlt die kristalloptische Analyse mit dem Polarisationsmikroskop.

Der Geologe *H. Vogelsang* veröffentlicht 1864 eine Arbeit „Über die mikroskopische Struktur der Schlacken und über die Beziehung der Mikrostruktur zur Genesis kristalliner Gesteine". Im Jahre 1873 erscheint von *H. Rosenbusch* die „Mikroskopische Physiografie der petrografisch wichtigen Mineralien, ein Hilfsbuch bei mikroskopischen Gesteinsstudien".

An der Verbesserung der Methodik der Polarisationsmikroskopie und der Polarisationsmikroskope haben noch andere Wissenschaftler wesentlichen Anteil: der Wiener Mineraloge *F. Becke*, der durch die Beckesche Linie bei der Brechzahlbestimmung bekannt geworden ist, der russische Mineraloge *E. S. Fedorow* als Erfinder des Universaldrehtisches, der Wiener Geologe *A. Rosiwal* mit seiner geometrischen Gesteinsanalyse in Verbindung mit Ermittlung der Mengenanteile, die deutschen Mineralogen *Th. Liebisch* und *M. Berek*. Letzterer hat sich besondere Verdienste um die Verbesserung des Polarisationsmikroskops und die Vervollkommnung des Zubehörs erworben. Erwähnenswert ist außerdem das von ihm 1924 erschienene Buch „Mikroskopische Mineralbestimmung mit Hilfe der Universaldrehtischmethoden", das im wesentlichen eine theoretische Fundierung dieser Methoden enthält. Im Jahre 1930 wird der nach ihm benannte Kompensator zur Messung sehr kleiner Gangunterschiede angegeben.

Inzwischen sind auch polarisationsoptische Untersuchungen im Auflicht durchgeführt worden, die heute vorwiegend in der Erzmikroskopie angewendet werden. Als Begründer der Erzmikroskopie kann der amerikanische Metallurge *W. Campbell* angesehen werden, der schon 1906 systematische Untersuchungen an Erzgesteinen im Auflicht durchgeführt hat. *F. Klockmann* führt 1912 die Erzmikroskopie im Bergbau und in der Lagerstättenforschung ein. *H. Schneiderhöhn* führt 1914 geologische und mineralogische Lagerstättenuntersuchungen durch und entwickelt für diesen Zweck zur Probenvorbereitung Anschleif- und Polierverfahren. Nach seinen Vorschlägen wurde von *Berek* das erste Erzmikroskop entwickelt. Von *Schneiderhöhn* und *Ramdohr* erscheint 1934 das Lehrbuch der Erzmikroskopie. Nachdem *H. Winter* schon 1913 mikroskopische Untersuchungen an Kohle im auffallenden Licht durchgeführt hat, werden ab 1930 schwache Ölimmersionen für die Kohlepetrografie entwickelt.

Etwa gleichzeitig mit der Polarisationsmikroskopie fand das Mikroskop immer stärkeren Eingang bei der Untersuchung metallischer Werkstoffe. Schon 1863 weist *H. C. Sorby* auf die Bedeutung der mikroskopischen Untersuchung der Metalle hin, und *F. H. Wenham* entwickelt den dafür erforderlichen Vertikalilluminator.

Bahnbrechend für die Entwicklung metallografischer Arbeitsverfahren wurden die von dem

Pionier der Metallografie *A. Martens* seit 1878 durchgeführten Arbeiten. Im Jahre 1897 entwickelte *H. Le Chatelier* das nach ihm benannte Auflichtmikroskop vom umgekehrten Typ.
Entscheidend für die Metallografie als Wissenschaft waren die von *G. Tamman* und seiner Schule seit 1905 durchgeführten metallografischen Untersuchungen im Zusammenhang mit der Lehre vom heterogenen Gleichgewicht, die eine Voraussetzung für die Entwicklung und den Aufschwung der Metallurgie bedeuteten. Mit metallografischen Methoden konnten alle grundsätzlichen Fragen der Metallkunde, wie Kristallisation und Kornverfeinerung, thermische Vergütung, Härtung, Kalt- und Warmverformung usw., geklärt werden. In diesem Zusammenhang darf auch der von *H. Hanemann* und *A. Schrader* herausgegebene „Atlas metallographicus", der eine große Anzahl ausgezeichneter Schliffbilder enthält, nicht unerwähnt bleiben. Heute bilden die mikroskopischen Verfahren für die gesamte Werkstoffkunde eine gesicherte und unentbehrliche Grundlage.
Mit Beginn des 20. Jahrhunderts glaubte man zunächst, daß die Entwicklung des Mikroskops, insbesondere der Mikroskopoptik, mit der Schaffung der homogenen Ölimmersion und der Apochromate im wesentlichen abgeschlossen sei. Daß dem nicht so war, zeigen besonders das Phasenkontrastverfahren und die Berechnung der Planachromate mit geebnetem Sehfeld. Das Phasenkontrastverfahren wurde 1932 von dem holländischen Physiker *F. Zernike* vorgeschlagen und brachte, wegen seiner weittragenden Bedeutung für die Biologie und Medizin, 1953 der Mikroskopie den zweiten Nobelpreis. War es doch erst damit möglich, die Entwicklung lebender Zellkulturen und Einzelzellen durch rein optische Kontrastierung, bei Verwendung stärkster Vergrößerungen, ungestört über längere Zeiträume zu beobachten, zu fotografieren und zu filmen und hierdurch einen tieferen Einblick in den Lebensablauf zu gewinnen. Die oft langwierigen Fixierungs- und Färbeverfahren haben zwar, besonders für diagnostische Zwecke, ihre Bedeutung behalten, sind aber in vielen Fällen durch das Phasenkontrastverfahren abgelöst worden.
Bei der Berechnung der Achromate und Apochromate mußte man sich zunächst damit abfinden, daß gleichzeitig nur der mittlere Teil des Bildfelds scharf erscheint. Für die Mikrofotografie hatte man schon 1918 in Form der von *H. Boegehold* berechneten Homale, negativer Projektionssysteme, einen Weg gefunden, um die den Objektiven anhaftende Bildfeldwölbung zu korrigieren. Diese Homale sind aber wegen ihrer negativen Brennweite für die visuelle Beobachtung nicht geeignet. Erst 1938 ist es *Boegehold* gelungen, die Bildfeldkrümmung der Objektive selbst zu beheben und gleichzeitig das nutzbare Feld zu vergrößern. Inzwischen haben alle größeren Mikroskopfirmen Planobjektive, und zwar Planachromate und z. T. auch Planapochromate, entwickelt.
Von den lichtmikroskopischen Verfahren, die erst in den letzten Jahren besondere Bedeutung erlangt haben, sind noch die Fluoreszenzmikroskopie, die Mikrofotometrie und die Interferenzmikroskopie zu erwähnen.
Nachdem *A. Köhler* schon 1904 aufgrund von Beobachtungen der Eigenfluoreszenz im Ultraviolettmikroskop die ersten Anregungen zur Fluoreszenzmikroskopie gegeben hatte, bauen 1911 *C. Reichert*, Wien, zusammen mit *O. Heimstädt* und 1913 *C. Zeiss* zusammen mit *H. Lehmann* die ersten handelsüblichen, mit Kohlebogenlampe ausgestatteten Fluoreszenzmikroskope.
Mit dieser mikroskopischen Untersuchungsmethode lassen sich, vor allem in biologischen und medizinischen Präparaten, sehr geringe Substanzmengen nachweisen, wenn diese bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht fluoreszieren. Das Fluoreszenzlicht ist nach größeren Wellenlängen verschoben. Man strahlt zweckmäßig Blaulicht oder langwelliges UV-Licht ein. Dann leuchten die fluoreszierenden Substanzen in einer Farbe des sichtbaren Spektrums auf. Bis 1929 wurde vorwiegend die Eigenfluoreszenz der Vitamine, Porphyrine, des Chlorophylls, Lignins, verschiedener Medikamente u. a. untersucht. Da jedoch die Eigenfluoreszenz sehr gering ist, sind keine hellen Fluoreszenzbilder zu erhalten.
Sind von Hause aus keine fluoreszierenden Substanzen im Präparat vorhanden, dann lassen sich in vielen Fällen die zu untersuchenden Präparate mit Fluorochromen anreichern und die Bildhelligkeit und Nachweisempfindlichkeit bestimmter Stoffe wesentlich erhöhen. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Einführung der Vitalfluoreszenzmikroskopie 1929 durch *P. Ellinger* und *H. Hirt*, der Fluorochromierung 1938 durch *H. Haitinger*, der Akridinorange als Vitalfluorochrom 1944 durch *S. Strugger* und die 1950 erfolgte Entdeckung der Immunfluoreszenz durch *A. H. Coons* und *M. H. Kaplan*.
Das ursprüngliche Ziel, durch Verwendung ultravioletten Lichts das Auflösungsvermögen zu steigern, ist heute zu einem sekundären Problem geworden. Viel wichtiger ist die Tatsache, daß die maßgeblich am Aufbau des Zellkerns beteiligten

Nukleinsäuren im ultravioletten Spektralbereich Absorptionsstellen enthalten, so daß man durch Mikrofotometrie im UV Art und Menge dieser Nukleinsäuren bestimmen und somit auf die Eigenschaften der Zelle schließen kann. *Caspersson* und seine Schule haben seit 1936 die Grundlagen für die zytologische Mikrofotometrie erarbeitet.

Die Interferenzmikroskopie ist schon relativ alt; denn bereits 1878 hat *Sirks* das erste Interferenzmikroskop beschrieben, das ein solchesfür Durchlicht war. Später, etwa seit den dreißiger Jahren, ist die Interferenzmikroskopie fast ausschließlich für Auflichtuntersuchungen an bearbeiteten Oberflächen verwendet worden. Doch größere Erfolge konnten erst in den letzten zwanzig Jahren erzielt werden, nachdem durch Anwendung neuer Verfahren und Verbesserung der Optikfertigung die Verwendung stärkster Objektive im Auf- und Durchlicht möglich wurde. Diese Entwicklung ist mit den Namen *Lebedeff*, *Linnik*, *Smith*, *Tolansky*, *Dyson*, *Françon*, *Nomarski* u. a. verbunden. Die Interferenzmikroskopie ist schon heute zum unentbehrlichen Hilfsmittel für verschiedene Arbeitsrichtungen in Biologie, Medizin und Technik geworden, obwohl sie sich hinsichtlich ihrer Anwendung erst am Anfang der Entwicklung befindet.

Das Mikroskop wird jetzt in den verschiedensten Arbeitsgebieten eingesetzt. Das zeigt sich neben vielen speziellen Anwendungen in den verschiedenen Bereichen der Naturwissenschaften, in den technischen Wissenschaften und der industriellen Produktion nicht zuletzt darin, daß es sich auch einen festen Platz in der experimentellen Atomphysik erobert hat, wo in Fotoemulsionen von schnellen geladenen Kernteilchen erzeugte Spuren mikroskopisch ausgemessen werden müssen.

Eine wesentliche Steigerung des Auflösungsvermögens um das mehr als 100fache ist, wegen der sehr kurzen Wellenlänge der Elektronenstrahlung, durch das vor etwa 45 Jahren entwickelte Elektronenmikroskop erreicht worden. Es hat Einblicke in Struktureinzelheiten ermöglicht, die schon in Molekulardimensionen liegen. Trotzdem kann es nicht mit dem Lichtmikroskop in Konkurrenz treten, weil die dazu erforderliche Präparation recht schwierig ist, es immer im Hochvakuum arbeitet und deshalb Lebendbeobachtungen nicht oder kaum möglich sind. Es hat dem Lichtmikroskop weiteren Auftrieb verliehen, weil schon zur Probenvorbereitung und zur Deutung der Bilder, bzw. für die Zuordnung der abgebildeten Struktureinzelheiten zum Lebensprozeß bei biologischen Objekten, stets das Lichtmikroskop erforderlich ist.

Auch heute ist die Entwicklung des Lichtmikroskops noch nicht abgeschlossen. Es wird sich weitere Anwendungsgebiete erobern, so daß seine Perspektive auf jeden Fall gesichert ist.

2. Optisches System des Mikroskops

von Dr. rer. nat. *Horst Riesenberg*

Die mikroskopische Abbildung wird durch das optische System des Mikroskops vermittelt, das i. allg. aus der Beleuchtungseinrichtung, dem Objektiv, eventuell einer Tubuslinse und dem Okular oder Projektiv besteht. In vielen modernen Mikroskopen kommen weitere Optiksysteme, wie Bildversetzungslinsen und Zwischenabbildungssysteme mit unterschiedlichen Funktionen, hinzu, die dem jeweiligen Verwendungszweck angepaßt sind und in den einschlägigen Abschnitten behandelt werden. Die Grundlagen zum Verständnis der Wirkungsweise von Optiksystemen bei der mikroskopischen Abbildung werden in diesem Abschnitt dargelegt.
Wichtige Begriffe, wie Brennweite, Abbildungsmaßstab und Vergrößerung, werden im Rahmen der Gaußschen Abbildung behandelt, die auch die Grundlage für die geometrisch-optische Theorie des Mikroskops bildet und zur Erläuterung des Strahlengangs dient. Die wellenoptische Betrachtungsweise soll zum tieferen Verständnis der mikroskopischen Abbildung durch fehlerfreie wie auch durch aberrationsbehaftete optische Systeme führen. Sie wird auf die Erscheinungen bei Abbildung eines leuchtenden Punkts angewendet. Die einzelnen Abbildungsfehler werden vornehmlich strahlenoptisch behandelt. In dem instrumentellen Teil des Abschnitts werden die wichtigsten funktionellen Baueinheiten des optischen Systems des Mikroskops so beschrieben, daß dem Benutzer die Auswahl und richtige Anwendung von Objektiven, Okularen und Kondensoren erleichtert wird.

2.1. Gaußsche Abbildung oder fehlerfreie Abbildung

Um bei der Abbildung eines Objekts durch ein optisches System den Ort und die Größe des Bilds zu bestimmen, kommt man i. allg. mit Begriffen und Beziehungen der Gaußschen Abbildungstheorie aus. Die Gaußsche Abbildung gilt für ein Gebiet in unmittelbarer Umgebung der optischen Achse (fadenförmiger Raum um die Achse, Gaußscher Raum, paraxialer Raum). Die Abbildung ist in diesem Raum scharf oder punktförmig, d. h., ein von einem Objektpunkt ausgehendes Strahlenbündel vereinigt sich nach der Abbildung durch das optische System in einem Punkt (homozentrisches Strahlenbündel). Abgesehen von wenigen Sonderfällen, ist eine punktförmige Abbildung nur im paraxialen Raum zu realisieren. Die Abbildung durch Strahlen, die sich nicht auf den paraxialen Raum beschränken, ist im allgemeinen nicht punktförmig, sondern mit Abbildungsfehlern behaftet. Man kann deshalb die Gaußsche Abbildung auch als fehlerfreie Abbildung bezeichnen.
Im Gaußschen Raum müssen die Winkel, die die abbildenden Strahlen mit der optischen Achse bilden – entweder als Öffnungs- oder als Feldwinkel –, so klein sein, daß ihre Sinus- und Tangensfunktionen durch die Winkel im Bogenmaß ersetzt werden dürfen, d. h., es muß gelten $\sin \sigma \approx \sigma$ und $\tan \sigma \approx \sigma$. Diese Aussage ist bei der Ableitung von Gleichungen wichtig, die für die Gaußsche Abbildung gelten.
Die punktförmige Abbildung im Gaußschen Raum ist die Basis für die geometrische Theorie der optischen Instrumente, weil sie zu eindeutigen Beziehungen zwischen Objektraum und Bildraum führt.
In den Bildern 2.1 a bis d sind die wichtigsten im Abschn. 2.1.2. zusammengestellten Begriffe der Gaußschen Abbildung dargestellt. Das optische System, z. B. ein Mikroskopobjektiv, ist in dieser Darstellung durch seine erste und seine letzte Linsenfläche mit den Linsenscheiteln S_1 und S_k wiedergegeben. Die Rotationsachse des optischen Systems ist die optische Achse.
Die Brenn- und Hauptpunkte sind die Kardinalpunkte eines optischen Systems. Durch ihre Lage ist das optische System derart charakterisiert, daß aus einem nach Ort und Größe gegebenen Objekt der Bildort und die Bildgröße analytisch oder grafisch ermittelt werden können.

2.1.1. Vorzeichenfestlegung

Sämtliche Strecken werden als gerichtete Strecken betrachtet, d.h., daß ihnen außer ihrem Betrag ein Vorzeichen zukommt. Als positive Richtung gilt die Lichtrichtung im Objektraum, die bei zeichnerischen Darstellungen immer von links nach rechts angenommen wird. Strecken, die in Lichtrichtung verlaufen, sind somit positiv, während entgegengesetzt der Lichtrichtung verlaufende Strecken negativ sind. Rechtwinklig zur optischen Achse nach oben laufende Strecken sind positiv und nach unten gerichtete negativ anzunehmen. Bei der Bezeichnung einer Strecke durch ihre beiden Begrenzungspunkte ist der erste als Ausgangspunkt für die Richtungsbestimmung festzulegen.

Beispiel: Da nach Definition gilt

$$f' = H'F' \quad \text{und} \quad \bar{f} = H\bar{F}, \tag{2.1}$$

ist im Bild 2.1c f' positiv und $\bar{f}$ negativ. Das wird im Bild 2.1d dadurch zum Ausdruck gebracht, daß das in der zeichnerischen Darstellung jeweils gültige Vorzeichen in Klammern gesetzt wird.

Nach der Vorzeichenfestlegung richtet sich die Gestalt der Abbildungsgleichungen. Nur eine konsequente Einhaltung der Vorschrift für die Vorzeichenbestimmung gewährleistet eine fehlerfreie Interpretation dieser Gleichungen.

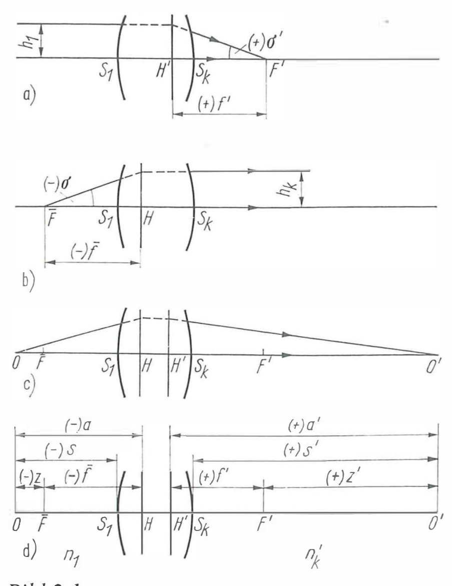


Bild 2.1

a) bis c) zeichnerische Erläuterung der Bedeutung der Brennpunkte, der Hauptpunkte bzw. -ebenen und der Brennweite eines zentrierten optischen Systems, das durch seine erste und letzte Linsenfläche dargestellt ist;
d) wichtige Strecken, die durch die Kardinalpunkte definiert sind.

2.1.2. Übersicht über die wichtigsten Begriffe und ihre Bezeichnungen in der Gaußschen Abbildung

Entsprechende Größen, die im Sinne von Objekt zu Bild einander zugeordnet sind, werden mit dem gleichen Buchstaben bezeichnet, wobei die Größe im Bildraum durch einen Strich (′) von der entsprechenden Größe im Objektraum unterschieden wird. Sind die Größen nicht im Sinne von Objekt zu Bild einander zugeordnet, d.h. optisch nicht konjugiert, so erhält die Größe im Objektraum einen Querstrich.

$\bar{F}$ Objektbrennpunkt, objektseitiger Brennpunkt, vorderer Brennpunkt

F' Bildbrennpunkt, bildseitiger Brennpunkt, hinterer Brennpunkt

H Objekthauptpunkt
H' Bildhauptpunkt
} weitere Bezeichnungsweisen wie bei den Brennpunkten

O Objektpunkt, Dingpunkt

O' Bildpunkt, auch Gaußscher Bildpunkt

B außeraxialer Objektpunkt

B' außeraxialer Bildpunkt

S_r Scheitel der r-ten Fläche. Den letzten Linsenscheitel eines optischen Systems aus k Flächen bezeichnen wir mit S_k

$\bar{f}$ Objektbrennweite, objektseitige Brennweite, vordere Brennweite
$\bar{f} = H\bar{F}$, entsprechend $f' = H'F'$

a Entfernung Objekthauptpunkt bis Objektpunkt, Objektweite, Gegenstandsweite
$a = HO$, entsprechend $a' = H'O'$
In den Abbildungsgleichungen sind a und a' die hauptpunktbezogenen Koordinaten.

s Entfernung Linsenscheitel der ersten Fläche bis Objektpunkt, Objektschnittweite
$s = S_1O$, entsprechend $s' = S_kO'$
In den Abbildungsgleichungen sind s und s' die scheitelpunktbezogenen Koordinaten.

z Entfernung Objektbrennpunkt bis Objektpunkt, objektseitige Brennpunktweite
$z = \bar{F}O$, entsprechend $z' = F'O'$
In den Abbildungsgleichungen sind z und z' die brennpunktbezogenen Koordinaten.

y Abstand eines außeraxialen Objektpunkts von der optischen Achse; meistens als Objektgröße $y = OB$ benutzt.
Entsprechend ist die Bildgröße $y' = O'B'$.

h Durchstoßhöhe eines Strahls durch eine brechende oder eine spiegelnde Fläche
Im folgenden bedeutet besonders:
h_1 Abstand eines objektseitigen Parallelstrahls von der optischen Achse
h_k Abstand eines bildseitigen Parallelstrahls von der optischen Achse

σ Winkel eines Strahls gegen die optische Achse, meistens mit der speziellen Bedeutung des halben Öffnungswinkels

σ_P Winkel eines Hauptstrahls gegen die optische Achse, Feldwinkel. Der Index P weist darauf hin, daß der Hauptstrahl dadurch gekennzeichnet ist, daß er durch eine Pupille geht (s. Abschn. 2.3.1.).

2.1.3. Definition der Brennweiten Abbildungsgleichung für den Fall eines im Brennpunkt oder Unendlichen gelegenen Objekts

Aus Bild 2.1a ergibt sich für die Bildbrennweite die Beziehung $f' = h_1/\tan\sigma'$. Entsprechend ergibt sich aus Bild 2.1b für die Objektbrennweite die Beziehung $\bar{f} = h_k/\tan\sigma$, wobei σ im Beispiel negatives Vorzeichen hat.
Diese beiden Beziehungen haben in der angegebenen Form keine strenge Gültigkeit, da die Darstellungen im Bild 2.1 für den Gaußschen Raum gelten, in dem die Strahlen mit der optischen Achse nur solch kleine Winkel bilden dürfen, deren Sinus- bzw. Tangensfunktionen durch die Winkel selbst ersetzt werden können. Durch Grenzwertbetrachtung erhält man folgende Definition der Brennweiten:

$$f' = \lim_{h_1 \to 0} \frac{h_1}{\sin\sigma'} = \lim_{h_1 \to 0} \frac{h_1}{\sigma'} \approx \frac{h_1}{\sigma'}$$
$$\bar{f} = \lim_{h_k \to 0} \frac{h_k}{\sin\sigma} = \lim_{h_k \to 0} \frac{h_k}{\sigma} \approx \frac{h_k}{\sigma}. \qquad (2.2)$$

Hierbei ist mit Rücksicht auf die später zu erläuternde Sinusbedingung die Tangensfunktion durch die Sinusfunktion ersetzt.
Die bildseitige Brennweite ist definiert als das Verhältnis des Achsenabstands eines zur Achse parallel einfallenden Strahls zum halben bildseitigen Öffnungswinkel, und zwar als Grenzwert, dem sich das Verhältnis mit abnehmendem Achsenabstand nähert. Entsprechendes gilt für die objektseitige Brennweite.
Für den praktischen Gebrauch in der Bild-

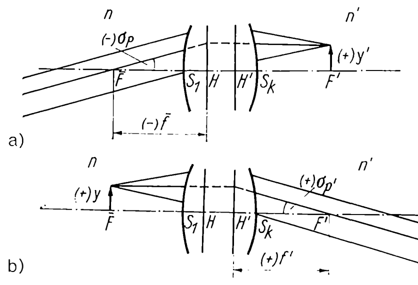


Bild 2.2. Definition der Brennweite eines optischen Systems durch schräg ein- bzw. austretende Parallelbündel

konstruktion (s. Abschn. 2.1.4.) sind die Gleichungen

$$f' = \frac{h_1}{\tan\sigma'} \quad \text{und} \quad \bar{f} = \frac{h_k}{\tan\sigma} \qquad (2.3\,a)$$

zu verwenden, die nur gültig sind, wenn $\tan\sigma \approx \sigma$ und $\tan\sigma' \approx \sigma'$ gesetzt werden kann.
Demgegenüber gelten bei aberrationsfreier Abbildung und erfüllter Sinusbedingung für beliebig große Winkel σ bzw. σ' die Gleichungen

$$f' = \frac{h_1}{\sin\sigma'} \quad \text{und} \quad \bar{f} = \frac{h_k}{\sin\sigma}. \qquad (2.3\,b)$$

Eine weitere Definition der Brennweite ergibt sich aus der Betrachtung eines schräg in ein optisches System einfallenden Parallelbündels, dessen Vereinigungspunkt in der Brennebene des optischen Systems liegt. Der Strahlenverlauf vor und nach dem optischen System ist im Bild 2.2 dargestellt. Der im Parallelbündel enthaltene Brennstrahl, d.h. der Strahl, der durch den Brennpunkt geht und an der zugehörigen Hauptebene achsenparallel abgeknickt wird, ist ausreichend, um eine weitere Gleichung für die Brennweite zu erhalten. Es ergibt sich aus Bild 2.2a $\bar{f} = y'/\tan\sigma_P$ und aus Bild 2.2b $f' = y/\tan\sigma_P'$.
Mit Rücksicht auf die Forderung der Gaußschen Abbildung, nur achsennahe Strahlen zuzulassen, gilt streng die Definition

$$f' = \lim_{\sigma'_P \to 0} \frac{y}{\tan\sigma_P'} = \lim_{\sigma'_P \to 0} \frac{y}{\sigma_P'} \approx \frac{y}{\sigma_P'}$$
$$\bar{f} = \lim_{\sigma_P \to 0} \frac{y'}{\tan\sigma_P} = \lim_{\sigma_P \to 0} \frac{y'}{\sigma_P} \approx \frac{y'}{\sigma_P}. \qquad (2.4)$$

Die bildseitige Brennweite ist hiernach definiert als das Verhältnis aus der Objektgröße y in der objektseitigen Brennebene zum Bildfeldwinkel σ_P' des schräg ausfallenden Parallelbündels, und zwar als Grenzwert, dem sich das Verhältnis mit ab-

nehmendem Bildfeldwinkel nähert. Entsprechend ergibt sich die objektseitige Brennweite als das Verhältnis der Bildgröße y' zur scheinbaren Objektgröße σ_P eines unendlich fernen Objekts.
Diese beiden Gleichungen sind für den praktischen Gebrauch sehr wichtig. Sie lauten in einer leicht verständlichen Form

$$\begin{aligned} y' &= \bar{f} \tan \sigma_P \\ y &= f' \tan \sigma'_P \end{aligned}, \quad \text{falls } \tan\sigma_P \approx \sigma_P \text{ und } \tan\sigma'_P = \sigma'_P \tag{2.5}$$

Diese Gleichungen dienen als Abbildungsgleichungen für die Abbildung eines unendlich fernen Objekts und solcher Objekte, die in der Brennebene des abbildenden Systems liegen. Zwischen der objektseitigen und der bildseitigen Brennweite besteht der Zusammenhang

$$\frac{f'}{\bar{f}} = -\frac{n'}{n}, \tag{2.6}$$

wobei n bzw. n' die Brechzahlen im Objekt- bzw. Bildraum sind. Grenzt das optische System beiderseitig an das gleiche Medium ($n' = n$), z. B. an Luft, so gilt

$$\bar{f} = -f'. \tag{2.6a}$$

Im Falle eines Immersionsobjektivs mit der Brechzahl n für die Immersionsflüssigkeit im Objektraum und $n' = 1$ im Bildraum erhält man $\bar{f} = -nf'$; d.h., die Objektbrennweite ist ihrem Betrage nach um den Faktor n größer als die Bildbrennweite.
Die für Berechnungen und theoretische Untersuchungen wichtige Unterscheidung zwischen Objekt- und Bildbrennweite ist zur Charakterisierung der Wirkung einer Linse oder eines optischen Systems unwesentlich (z. B. in Katalogen oder bei einfachen Überlegungen). Man betrachtet das optische System als beiderseitig an Luft grenzend und führt als Systemkonstante die Brennweite f ein, die stets das Vorzeichen der Bildbrennweite hat.
Eine Linse oder ein optisches System hat eine sammelnde Wirkung, wenn f' (und damit f als Systemkonstante) positiv ist. Bei zerstreuender Wirkung ist f' (und damit f) negativ.
Die Brennweite wird meist in Millimeter angegeben. Den reziproken Wert der Brennweite $1/f$ nennt man Brechkraft und mißt sie in Dioptrien (dpt); f ist dabei in Meter einzusetzen. Die Dioptrie hat also die Einheit m^{-1}. Beispiel: Eine Linse mit der Brennweite $f' = +200$ mm hat die Brechkraft $1/0{,}2$ m $= +5$ dpt.

2.1.4. Bildkonstruktion

Die Zeichenverfahren der geometrischen Optik beruhen auf Begriffen aus der Gaußschen Abbildungstheorie. In den Bildern 2.1 und 2.2 sind zur Erläuterung der Hauptpunkte, der Brennpunkte und der Brennweiten Strahlen gezeichnet. Die wichtigsten sind die Brennstrahlen und die Achsenparallelstrahlen, die durch einen Brennpunkt gehen und an der zugehörigen Hauptebene parallel zur optischen Achse abgeknickt werden. Die Brenn- und Achsenparallelstrahlen können zur konstruktiven Ermittlung des Ortes und der Größe des Bilds eines gegebenen Objekts verwendet werden. Unter einer besonderen Bedingung kann auch noch der Hauptpunktstrahl als Konstruktionsstrahl verwendet werden. Der im Objektraum durch den Objekthauptpunkt gehende Strahl verläßt das optische System parallel zum einfallenden Strahl und verläuft durch den Bildhauptpunkt, wenn das optische System auf beiden Seiten an das gleiche Medium grenzt.
Grundsätzlich ist zu beachten, daß die gezeichneten Strahlen idealisierte Strahlen sind, die in den wirklich abbildenden Strahlenbündeln meist gar nicht vorkommen, weil man bei der Bildkonstruktion Strahlen verwendet, deren Winkel mit der optischen Achse verhältnismäßig groß sind. Die Strahlen sind nicht mehr achsennah. Die Aussagen, die man durch die Bildkonstruktion über den Ort und die Größe des einem Objekt zugeordneten Bilds erhält, sind für den Bereich des Gaußschen Raums trotzdem gültig. Das ist verständlich, wenn man sich die gezeichneten Strahlen in

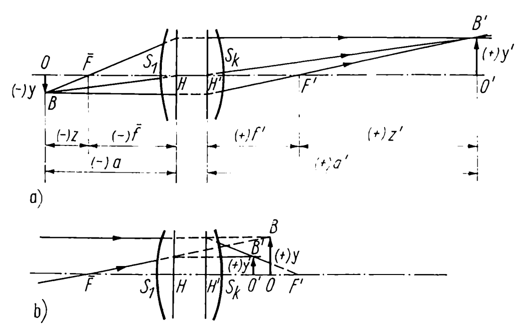


Bild 2.3. Bildkonstruktion

a) Abbildung eines reellen Objekts durch eine Sammellinse oder ein sammelndes optisches System, z. B. vergrößernde Abbildung eines Mikroskopobjektivs mit endlicher Bildweite;
b) Abbildung eines virtuellen Objekts durch eine Sammellinse oder ein sammelndes optisches System, z. B. Wirkung der Feldlinse eines Huygensschen Okulars

Richtung auf die optische Achse zusammengeschrumpft vorstellt. Orte und Größenverhältnisse werden dadurch nicht geändert. Der Strahlenverlauf nähert sich im Objekt- und im Bildraum mehr und mehr dem tatsächlichen.
Im Bild 2.3 ist die Bildkonstruktion für die Abbildung durch ein sammelndes optisches System dargestellt. Häufig ist es einfacher, die Abbildung rechnerisch zu ermitteln.

2.1.5. Abbildungsgleichungen

2.1.5.1. Abbildungsmaßstab

Das Verhältnis von Bildgröße y' zu Objektgröße y heißt Abbildungsmaßstab. Er wird in der praktischen Mikroskopie mit M bezeichnet.

$$M = \frac{y'}{y}. \tag{2.7}$$

Entsprechend der Vorzeichenfestlegung im Abschn. 2.1.1. kann M positiv oder negativ sein, je nachdem y und y' gleiches oder unterschiedliches Vorzeichen haben.
Negatives M gibt ein umgekehrtes Bild, positives M ein aufrechtes. Ist $|M| > 1$, ergibt sich ein vergrößertes, bei $|M| < 1$ ein verkleinertes Bild. Beispiele für den Abbildungsmaßstab sind: $M = -25$ oder $|M| = 25$ oder Maßstab 25 : 1.

2.1.5.2. Newtonsche Abbildungsgleichung

Zur Berechnung des Abbildungsmaßstabes – und damit der Bildgröße bei gegebener Objektgröße – sowie des Bildorts werden die brennpunktbezogenen Koordinaten $z = \bar{F}O$ und $z' = F'O'$ benutzt. Es gilt für den Abbildungsmaßstab

$$M = -\frac{z'}{f'} \tag{2.8}$$

und

$$M = -\frac{\bar{f}}{z}.$$

Die eigentliche Newtonsche Gleichung erhält man durch Gleichsetzen der beiden Ausdrücke:

$$zz' = \bar{f}f'. \tag{2.9}$$

Für den Sonderfall, daß das abbildende optische System beiderseitig an das gleiche Medium grenzt (z.B. an Luft), gilt nach Gl. (2.6a) $\bar{f} = -f'$ und somit

$$zz' = -f'^2. \tag{2.9a}$$

Aus der Schreibweise $z' = -f'^2/z$ erkennt man, daß mit gegen Null strebendem z die Größe z' gegen unendlich strebt. Auch der Abbildungsmaßstab M wird dann unendlich groß. Für $z = 0$ befindet sich das Objekt im objektseitigen Brennpunkt, und die Abbildung wird durch Gl. (2.5) geregelt. Das gilt auch für den Fall $z' = 0$.

2.1.5.3. Allgemeine Abbildungsgleichung

Es werden die hauptpunktbezogenen Koordinaten $a = HO$ und $a' = H'O'$ angewendet. In allgemeiner Form, d.h. wenn die Brechzahl im Objektraum n und im Bildraum n' ist, lautet die Abbildungsgleichung

$$\frac{f'}{a'} + \frac{\bar{f}}{a} = 1 \tag{2.10}$$

oder

$$\frac{n'}{a'} - \frac{n}{a} = \frac{n'}{f'}. \tag{2.11}$$

Für den Abbildungsmaßstab gilt

$$M = \frac{na'}{n'a}. \tag{2.12}$$

Wenn das abbildende optische System beiderseitig an das gleiche Medium (z.B. an Luft) grenzt, erhält man die Abbildungsgleichung

$$\frac{1}{a'} - \frac{1}{a} = \frac{1}{f'}. \tag{2.13}$$

$$M = \frac{a'}{a}. \tag{2.14}$$

Die Abbildungsgleichung in dieser Gestalt ist wohl am bekanntesten, weil sie bei der Anwendung auf dünne Linsen, bei denen die Hauptpunkte (bzw. -ebenen) H und H' mit dem Ort der Linse zusammenfallen, die „anschaulichen" Größen Gegenstandsweite a und Bildweite a' enthält. Bei dicken Linsen und optischen Systemen muß jedoch erst die Lage der Hauptebenen bekannt sein, ehe mit den auf sie bezugnehmenden Größen a und a' sinnvolle Berechnungen und Überlegungen durchgeführt werden können. Die Lage der Hauptebenen ermittelt man in der Praxis meist aus der Brennweite und der Lage der Brennpunkte unter Beachtung der Beziehungen $f' = H'F'$ und $\bar{f} = H\bar{F}$. In diesen allgemeineren Fällen ist es einfacher, mit der Newtonschen Abbildungsgleichung zu rechnen.

2.1.6. Tiefenmaßstab, Winkelverhältnis und ihr Zusammenhang mit dem Abbildungsmaßstab

2.1.6.1. Tiefenmaßstab oder Tiefenverhältnis

Verschiebt man ein Objekt längs der optischen Achse um einen kleinen Betrag Δz von O_1 nach O_2 (Bild 2.4), so verschiebt sich das Bild um den Betrag $\Delta z'$ von O_1' nach O_2'. Man bezeichnet

$$\alpha = \frac{\Delta z'}{\Delta z} = \frac{n'}{n} M^2 \tag{2.15}$$

als das Tiefenverhältnis oder den Tiefenmaßstab.

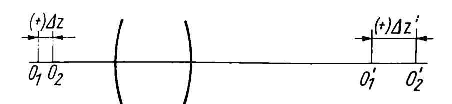


Bild 2.4. Tiefenmaßstab

Liegt O_1 im Brennpunkt des optischen Systems und somit O_1' im Unendlichen, so ist Gl. (2.15) nicht zutreffend. In diesem Fall kann die Abbildung eines benachbarten Objektpunkts direkt aus der Newtonschen Abbildungsgleichung bestimmt werden. Zahlenmäßige Angaben für das Tiefenverhältnis: z.B. $\alpha = 625$ oder Tiefenmaßstab 625 : 1.

2.1.6.2. Winkelverhältnis

Das Winkelverhältnis oder Konvergenzverhältnis ist als Verhältnis des bildseitigen Öffnungswinkels zum objektseitigen Öffnungswinkel eines abbildenden Öffnungsstrahls (Bild 2.5) definiert:

$$\gamma = \frac{\sigma'}{\sigma}. \tag{2.16}$$

Es gilt

$$\gamma = \frac{n}{n'} \frac{1}{M} \tag{2.17}$$

oder $(n'\sigma') : (n\sigma) = y : y'$.

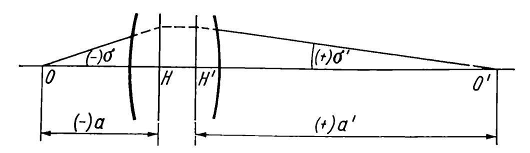


Bild 2.5. Winkelverhältnis

Ein großer Abbildungsmaßstab ist mit einem kleinen Winkelverhältnis verknüpft und umgekehrt. Bezeichnet man das Produkt aus Brechzahl und Öffnungswinkel als numerische Apertur im Gaußschen Raum, so kann man auch sagen, die bildseitige numerische Apertur verhält sich zur objektseitigen numerischen Apertur des Gaußschen Raumes wie Objektgröße zu Bildgröße. Noch eine weitere Interpretation ist möglich. Da Gl. (2.17) auch

$$yn\sigma = y'n'\sigma'$$

geschrieben werden kann, erkennt man, daß die Größe $yn\sigma$ eine Invariante bei der optischen Abbildung ist. Sie ist als Helmholtz-Lagrangesche Invariante bekannt.
Zahlenmäßige Angaben für das Winkelverhältnis: z.B. $\gamma = 0{,}04$ oder Winkelverhältnis 1 : 25.

2.1.7. Vergrößerung

Die vergrößernde Wirkung eines optischen Geräts, das man subjektiv benutzt, wird durch die „Vergrößerung" angegeben. Dieser Begriff ist nur verständlich, wenn man die „scheinbare Größe" eines Objekts und die eines im Gerät sichtbaren Bilds einführt.

2.1.7.1. Scheinbare Größe

Die scheinbare Größe eines Objekts oder Bilds ist der Winkel (Gesichtswinkel, Sehwinkel), unter dem das Objekt dem Auge erscheint. Dieser Winkel wird durch die beiden Strahlen gebildet, die von den Endpunkten des Objekts oder Bilds ausgehen und durch die Pupillenmitte des ruhenden Auges gehen.
Ausgedehntere Gegenstände werden durch Blicken mit bewegtem Auge – bei ruhendem Kopf – erfaßt, wobei der Schnittpunkt der von den Einzelheiten des ausgedehnten Gegenstands ausgehenden Strahlen durch den Augendrehpunkt geht, der etwa 10 bis 11 mm hinter dem Hornhautscheitel liegt. Das Schauen als natürlicher Sehvorgang mit Bewegung von Auge, Kopf und eventuell Körper interessiert im Zusammenhang mit der Beobachtung in optischen Geräten nicht. Für die Detailerkennung und ihre Vergrößerung kann man davon ausgehen, daß mit ruhendem Auge beobachtet wird. Befindet sich ein Gegenstand im Unendlichen, so ist seine Ausdehnung nur durch seine scheinbare Größe σ_P beschreibbar (Bild 2.6a). Liegt das Objekt im Endlichen (Bild 2.6b), so

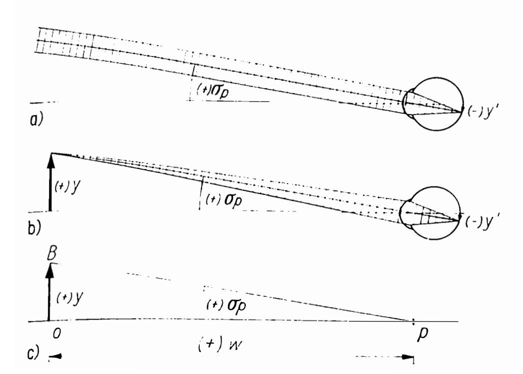


Bild 2.6. Scheinbare Größe σ_P eines Gegenstands

besteht zwischen der Objektgröße y, dem Betrachtungsabstand bzw. der Sehweite w und der scheinbaren Größe σ_P des Objekts der Zusammenhang

$$\tan \sigma_P = \frac{y}{w} \tag{2.18}$$

oder bei kleinem y

$$\sigma_P = \frac{y}{w}. \tag{2.18a}$$

Im Bild 2.6c gibt P den Augenort an, der bei ruhendem Auge mit der Pupillenmitte des Auges identisch ist. Zwischen scheinbarer Größe und der Größe des Netzhautbilds besteht aufgrund der Abbildung im Auge eine direkte Proportionalität, wie aus dem schematischen Strahlenverlauf (Bild 2.6) für einen außeraxialen Objektpunkt zu erkennen ist. Die scharfe Abbildung des Objekts auf der Netzhaut wird bei unterschiedlichen Betrachtungsabständen durch die Akkommodation des Auges bewirkt.

Bei der Betrachtung von Gegenständen mit dem bloßen Auge ist der Betrachtungsabstand eine meßbare Größe, auf die sich die Akkommodation des Auges einzurichten hat, wenn der Gegenstand scharf gesehen werden soll. Anders ist die Situation bei der Betrachtung eines Bilds, das durch ein optisches Gerät von einem Gegenstand erzeugt wird. Hier bestimmt das Auge durch seine Akkommodation den Betrachtungsabstand bzw. die Sehweite. Ob das Auge auf unendliche oder auf endliche Sehweite akkommodiert, ist individuell verschieden. Die Akkommodation ist jedoch für die Größenempfindung von untergeordneter Bedeutung, weil diese nur von der scheinbaren Größe σ_P abhängt.

Damit man Details erkennen kann, muß σ_P einen gewissen Mindestwert haben, weil das Auge aufgrund der Struktur der Netzhaut nur ein beschränktes Auflösungsvermögen hat. Um punktförmige Objekte noch getrennt wahrzunehmen, müssen sie unter einem Sehwinkel von etwa 1′ erscheinen. Um bequem beobachten zu können, sollte der Sehwinkel zwischen 2′ und 4′ betragen.

Tafel 2.1. Beziehung zwischen dem Abstand zweier Punkte und dem Sehwinkel, unter dem sie in der konventionellen Sehweite erscheinen

σ_P	10″	1′	2′	4′	
y	0,0125	0,075	0,15	0,30	in mm

bei w = 250 mm

Tafel 2.1 vermittelt eine Vorstellung davon, wie groß die Details sind (bzw. der Abstand zweier Punkte), die dem angegebenen Sehwinkel σ_P entsprechen und in der konventionellen Sehweite von 250 mm betrachtet werden. Der Sehwinkel von 10″ entspricht der sog. Noniensehschärfe. Das ist der Grenzwinkel für die Erkennbarkeit zweier gegeneinander verschobener Striche.

Wenn die Details so klein sind, daß ihre scheinbare Größe nicht in den bequemen Sehwinkelbereich zwischen 2′ und 4′ fällt und dies auch nicht durch Verkürzen des Betrachtungsabstands erreicht werden kann, bedient man sich optischer Geräte, die vergrößernd wirken, d.h., die von dem Objekt ein Bild erzeugen, das dem Auge unter größerem Sehwinkel σ_P erscheint als das Objekt bei Betrachtung ohne Gerät.

2.1.7.2. Definition der Vergrößerung

Die Vergrößerung wird in der praktischen Mikroskopie mit V bezeichnet und wie folgt definiert:

$$V = \frac{\sigma_P'}{\sigma_P} = \frac{\text{scheinbare Größe des im Gerät sichtbaren Bilds}}{\text{scheinbare Größe des Objekts bei Betrachtung mit bloßem Auge}} \tag{2.19}$$

2.1.7.3. Lupenvergrößerung, Mikroskopvergrößerung, Okularvergrößerung

Nach Gl. (2.19) kann man die Vergrößerung subjektiv benutzter optischer Geräte, wie Leseglas, Lupe, Mikroskop und Okular, berechnen, wobei die Brennweite des zugrunde liegenden optischen Systems die ausschlaggebende Größe ist, während die Lage des Auges und sein Akkommodations-

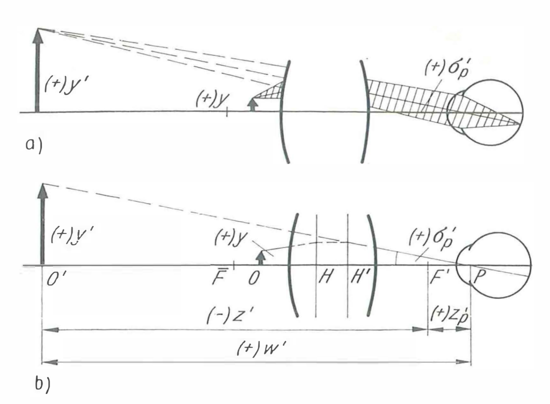


Bild 2.7. Vergrößerung eines optischen Systems

a) Abbildungsstrahlengang;
b) Darstellung des Hauptstrahlenverlaufs durch die Pupillenmitte des Auges und seine Bezugnahme auf die Gaußschen Grundpunkte
Bei der Vergrößerung wird die scheinbare Größe σ'_P des im Gerät sichtbaren Bilds mit der scheinbaren Größe σ_P des Gegenstands bei Betrachtung mit bloßem Auge (Bild 2.6) verglichen

zustand in den meisten Fällen von untergeordneter Bedeutung sind. Es gilt

$$V = \frac{250}{f'}\left(1 - \frac{z'_P}{w'}\right), \text{ alle Strecken in mm.} \tag{2.20}$$

Im Bild 2.7 ist der Abbildungsstrahlengang eines vergrößernden optischen Systems dargestellt, bei dem ein Objekt von der Größe y in ein virtuelles Bild y' abgebildet wird, dessen scheinbare Größe σ'_P ist und das durch den Akkommodationszustand des Auges in der Entfernung $w' = O'P$ gesehen wird. Der Augenort P ist durch die Brennpunktkoordinate z'_P gegeben. In Gl. (2.20) wird vorausgesetzt, daß diejenige scheinbare Größe des Objekts zum Vergleich herangezogen wird, die entsteht, wenn das Objekt in der konventionellen Sehweite $w_0 = 250$ mm betrachtet wird. Da die Entfernung w', in der das Bild gesehen wird – aufgrund der individuellen Akkommodation des Auges –, wesentlich größer ist als die Entfernung der Augenpupille vom bildseitigen Brennpunkt des optischen Systems, kann der Term z'_P/w' gegenüber 1 vernachlässigt werden, und man erhält einen Ausdruck für die Vergrößerung, der nur noch von der Brennweite des Systems abhängt. Man bezeichnet

$$\mathrm{V} = \frac{250}{f'}, \quad f' \text{ in mm,} \tag{2.21}$$

speziell als die Lupenvergrößerung und spricht z.B. auch von der Lupenvergrößerung des Mikroskops oder des Okulars. Es ist jedoch ausreichend, einfach von der Vergrößerung des Mikroskops oder des Okulars zu sprechen, wenn sie nach Gl. (2.21) bestimmt worden ist.

Wir wollen noch einige Sonderfälle anhand der Gl. (2.20) betrachten. Bei Akkommodation auf Unendlich ($w' = \infty$) folgt für eine beliebige Lage des Augenorts Gl. (2.21) $V = 250/f'$. Das Objekt befindet sich dann im objektseitigen Brennpunkt des optischen Systems. Fällt der Augenort mit dem bildseitigen Brennpunkt zusammen ($z'_P = 0$), so ergibt sich für eine beliebige Sehweite w' ebenfalls die einfache Gleichung für die Lupenvergrößerung $V = 250/f'$. Schließlich erhält man bei Akkommodation auf die konventionelle Sehweite $w' = w_0 = 250$ mm und $z'_P = -f'$, d.h., wenn der Augenort mit der bildseitigen Hauptebene zusammenfällt oder in praxi, wenn das Auge dicht an einer (schwachen) Lupe liegt, die Beziehung

$$V = \frac{250}{f'} + 1\,.$$

Zahlenmäßige Angabe für die Vergrößerung:

z.B. V = 10 × (lies 10fach).

Dieser Lupenvergrößerung entspricht nach Gl. (2.21) die Brennweite 25 mm.

2.1.8. Gaußsche Abbildung durch zusammengesetzte optische Systeme

Hinsichtlich der Abbildung von einzelnen Linsen und Spiegeln wird auf entsprechende Nachschlagewerke, z.B. „ABC der Optik“ [32] und Taschenbuch Feingerätetechnik [48], verwiesen.

Als ein optisches System bezeichnen wir eine aus Linsen und/oder Spiegeln bestehende optische Anordnung, die eine funktionelle Einheit bildet. Beispiele für optische Systeme sind Objektiv, Okular, Kondensor und Bildversetzungssystem. Im einfachsten Fall ist unter dem optischen System eine Linse zu verstehen. Zusammengesetzte optische Systeme bilden übergeordnete funktionelle Einheiten. Die Kombination aus Objektiv und Okular z.B. bildet das optische System eines Mikroskops oder eines Fernrohrs.

Von den optischen Systemen seien die Brennweiten und die Lage der Brennpunkte – und damit auch der Hauptpunkte – bekannt. Man fragt nach der Brennweite, der Lage der Brennpunkte und nach dem Abbildungsmaßstab bzw. der Vergrößerung eines aus zwei optischen Systemen zusammengesetzten optischen Systems.

2.1.8.1. Aus zwei optischen Systemen zusammengesetztes optisches System mit von Null verschiedener optischer Tubuslänge (z.B. Mikroskop)

Als optische Tubuslänge wird die (gerichtete) Strecke

$$t = F_1'\bar{F}_2$$

bezeichnet, also die Entfernung des objektseitigen Brennpunkts $\bar{F}_2$ des zweiten optischen Systems mit der Brennweite f_2' (bzw. $\bar{f}_2$) vom bildseitigen Brennpunkt F_1' des ersten optischen Systems mit der Brennweite f_1' (bzw. $\bar{f}_1$). Die Bildkonstruktion zur Bestimmung der Bildbrennweite f' und der Lage des bildseitigen Brennpunkts F' des zusammengesetzten optischen Systems wird im Bild 2.8 dargestellt. Entsprechend können $\bar{f}$ und $\bar{F}$ für das zusammengesetzte System ermittelt werden.
Es gelten folgende Beziehungen:

$$f' = -\frac{f_1' f_2'}{t} \qquad (2.22)$$

$$\bar{f} = \frac{\bar{f}_1' \bar{f}_2}{t}. \qquad (2.22a)$$

Die Lage des Brennpunkts ist durch

$$z_2' = F_2'F' = -\frac{\bar{f}_2 f_2'}{t} \qquad (2.23)$$

und die Lage des Objektbrennpunkts durch

$$z_1 = \bar{F}_1\bar{F} = \frac{\bar{f}_1 f_1'}{t} \qquad (2.23a)$$

bestimmt.
Für die Brennweite f' des zusammengesetzten optischen Systems ergibt sich mit Einführung der Größe

$$e = H_1'H_2$$

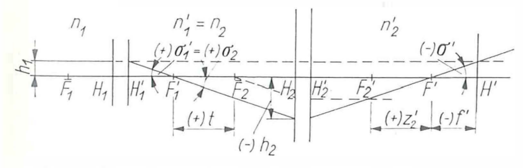


Bild 2.8. Bildkonstruktion zur Bestimmung der Bildbrennweite f' und der Lage des bildseitigen Brennpunkts F' eines zusammengesetzten optischen Systems mit der optischen Tubuslänge $t = F_1'\bar{F}_2$

Der durch $\bar{F}_2$ gestrichelt gezeichnete Brennstrahl, der parallel zum Brennstrahl durch F_1' verläuft, ist als Hilfsstrahl erforderlich, um den bildseitigen Strahl zeichnen zu können. Bildseitiger Strahl und Hilfsstrahl schneiden sich in der durch F_2' gehenden Brennebene

(und der praktisch immer gültigen Voraussetzung, $n_2' = n_2$) der folgende Ausdruck:

$$f' = \frac{f_1' f_2'}{f_1' + f_2' - e}$$

oder

$$\frac{1}{f'} = \frac{1}{f_1'} + \frac{1}{f_2'} - \frac{e}{f_1' f_2'}. \qquad (2.24)$$

Er ist nützlich, wenn die Zusammensetzung zweier Linsen betrachtet wird. Bei unendlich dünnen Linsen ist e der Linsenabstand.
Faßt man das erste optische System als Mikroskopobjektiv mit f_{Obj}', das zweite optische System als Okular mit f_{Ok}' auf, so erhält man als bildseitige Brennweite des aus Objektiv und Okular zusammengesetzten Mikroskops nach Gl. (2.22)

$$f_{\mathrm{Mikr}}' = -\frac{f_{\mathrm{Obj}}' f_{\mathrm{Ok}}'}{t} = -f_{\mathrm{Obj}}' \frac{f_{\mathrm{Ok}}'}{t}. \qquad (2.25)$$

Man erkennt, daß die Gesamtbrennweite des Mikroskops f_{Mikr}' um den Faktor f_{Ok}'/t kleiner als die Objektivbrennweite wird. Da die optische Tubuslänge im Mikroskop beträchtlich größer als die Okularbrennweite ist, ergibt sich, daß eine kleine Brennweite des zusammengesetzten Mikroskops erzielt werden kann, auch wenn die Brennweiten von Objektiv und Okular verhältnismäßig groß sind. Im Vergleich zu einem einfachen optischen System gleicher Stärke (gleicher Brennweite) hat das zusammengesetzte erhebliche Vorteile. Die optischen Systeme des zusammengesetzten Systems sind aufgrund ihrer größeren Brennweiten leichter herzustellen und lassen eine bessere Korrektion vor allem der außeraxialen Bildfehler zu.

2.1.8.2. Aus zwei optischen Systemen zusammengesetztes System mit parallelem Strahlengang zwischen ihnen (z.B. Mikroskopobjektiv für unendliche Bildweite mit Tubuslinse)

Befindet sich das Objekt in der objektseitigen Brennebene eines optischen Systems, so verlassen die von einem Objektpunkt ausgehenden Strahlen das System parallel (Bild 2.9). Der Zusammenhang zwischen der Objektgröße y_1, dem Bildfeldwinkel $\sigma_{\mathrm{p},1}'$ des ausfallenden Parallelbündels und der Brennweite f_1' des optischen Systems ist nach Gl. (2.5) gegeben durch

$$y_1 = f_1' \tan \sigma_{\mathrm{P}1}'.$$

Das in das zweite optische System einfallende Parallelbündel erzeugt in dessen bildseitiger

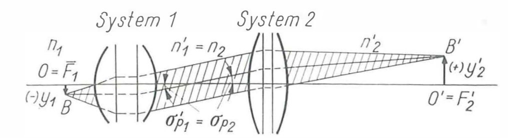


Bild 2.9. Abbildung bei einem aus zwei optischen Systemen mit den Brennweiten f'_1 und f'_2 zusammengesetzten optischen System mit der Besonderheit, daß das Objekt in der objektseitigen Brennebene des Systems 1 liegt. Das führt zu parallelem Strahlengang zwischen den Systemen 1 und 2

Beispiel: Mikroskopobjektiv für unendliche Bildweite mit Tubuslinse

Brennebene einen Bildpunkt, dem eine Bildgröße y'_2 entspricht, für die ebenfalls nach Gl. (2.5) gilt

$$y'_2 = \bar{f}_2 \tan \sigma_{P2}.$$

Durch $\sigma_{P2} = \sigma'_{P1}$ erhält man für den Abbildungsmaßstab

$$M = \frac{y'_2}{y_1} = \frac{\bar{f}_2}{f'_1}.$$

Mit $n'_2 = n_2$ ergibt sich nach Gl. (2.6) bzw. Gl. (2.6a) für den Abbildungsmaßstab des zusammengesetzten Systems die wichtige Beziehung

$$M = -\frac{f'_2}{f'_1}. \tag{2.26}$$

Der Abbildungsmaßstab M ist vom Abstand der beiden optischen Systeme unabhängig.

Faßt man das erste optische System als Mikroskopobjektiv mit unendlicher Bildweite auf, dessen Brennweite f'_{Obj} und dessen Vergrößerung nach Gl. (2.21) $V_{\text{Obj}} = 250/f'_{\text{Obj}}$ ist, während das zweite optische System eine Tubuslinse oder ein Tubussystem mit der Brennweite f'_{Tub} sei, so erhält man nach Gl. (2.26) für den Abbildungsmaßstab des zusammengesetzten Systems aus Mikroskopobjektiv und Tubuslinse

$$M = -\frac{f'_{\text{Tub}}}{f'_{\text{Obj}}} \tag{2.27}$$

$$M = -V_{\text{Obj}} \frac{f'_{\text{Tub}}}{250}, \quad f'_{\text{Tub}} \text{ in mm.} \tag{2.27a}$$

Hat die Tubuslinse eine Brennweite von 250 mm, so stimmt der Abbildungsmaßstab des Systems aus Objektiv und Tubuslinse mit der aufgravierten Vergrößerung V_{Obj} des Objektivs überein. Das negative Vorzeichen weist darauf hin, daß bei der Abbildung eine Bildumkehr erfolgt. Kommt es nur auf die zahlenmäßige Angabe des Abbildungsmaßstabs an, so kann man auf das Vorzeichen verzichten.

Der Quotient

$$q_\infty = \frac{f'_{\text{Tub}}}{250}, \quad f'_{\text{Tub}} \text{ in mm,} \tag{2.28}$$

wird Tubusfaktor genannt. Weicht er von Eins ab, so wird er auf den entsprechenden Tubusteil aufgraviert. Bei $f'_{\text{Tub}} = 160$ mm wird z. B. $q_\infty = 0{,}63$, und man graviert $0{,}63\times$.

2.1.8.3. Aus zwei optischen Systemen zusammengesetztes afokales System (z. B. Fernrohr)

Fällt der bildseitige Brennpunkt F'_1 eines optischen Systems der Brennweite f'_1 mit dem objektseitigen Brennpunkt $\bar{F}_2$ eines zweiten optischen Systems der Brennweite f'_2 zusammen (Bild 2.10), so verläßt ein einfallendes Parallelbündel das zusammengesetzte System wieder parallel. Es entsteht kein Brennpunkt. Das zusammengesetzte System ist afokal. Die im Abschn. 2.1.8.1. erläuterte optische Tubuslänge $t = F'_1\bar{F}_2$ ist Null, und nach Gl. (2.22) werden f' und $\bar{f}$ unendlich.

Fernrohrvergrößerung

Im Bild 2.10a ist der Strahlengang in einem afokalen System für ein schräg einfallendes Parallelbündel dargestellt. Die scheinbare Größe σ_P eines im Unendlichen gelegenen Objekts (vgl. Bild 2.6a) wird durch das optische Gerät – ein Fernrohr – in die scheinbare Größe σ'_P des Bilds umgewandelt. Nach der allgemeingültigen Definition der Vergrößerung Gl. (2.19) gilt für die Fernrohrver-

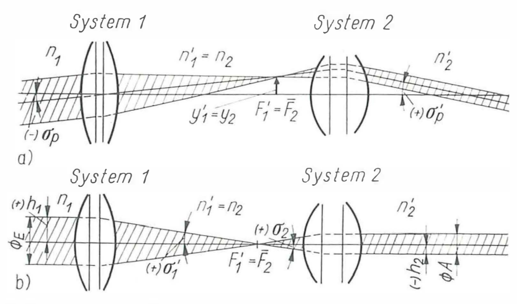


Bild 2.10. Abbildung bei einem aus zwei optischen Systemen mit den Brennweiten f'_1 und f'_2 zusammengesetzten afokalen System

Systeme *1* und *2* können als Objektiv und Okular eines Keplerschen Fernrohrs aufgefaßt werden

Beispiel aus der Mikroskopie: Tubuslinse und Okular

a) Strahlengang für einen unendlich fernen Objektpunkt mit dem Objektfeldwinkel σ_P;

b) Strahlengang für einen unendlich fernen Objektpunkt, der in Richtung der optischen Achse liegt

größerung, die man mit dem Index F kennzeichnet,

$$V_F = \frac{\sigma'_P}{\sigma_P} \approx \frac{\tan \sigma'_P}{\tan \sigma_P},$$

und man erhält mit Gl. (2.5)

$$V_F = -\frac{f'_1}{f'_2} \tag{2.29}$$

Ein parallel zur optischen Achse einfallendes Parallelbündel (Bild 2.10b) vom Dmr. $\varnothing_E$ tritt aus dem afokalen System als Parallelbündel aus mit dem veränderten Dmr. $\varnothing_A$. Mit der Fernrohrvergrößerung besteht der Zusammenhang

$$|V_F| = \frac{\varnothing_E}{\varnothing_A}. \tag{2.30}$$

2.2. Strahlengang im zusammengesetzten Mikroskop – Vergrößerung – Abbildungsmaßstab

Die wichtigsten Grundlagen für die Gaußsche Abbildung durch das zusammengesetzte Mikroskop, das im einfachsten Fall aus Objektiv und Okular besteht, sind im Abschn. 2.1.8. angegeben. Darauf aufbauend, wird in diesem Abschnitt der Strahlengang im Mikroskop erläutert, sowohl bei subjektiver Benutzung als auch bei Mikrofotografie bzw. Mikroprojektion. Die zugehörigen Gleichungen für die Vergrößerung bzw. den Abbildungsmaßstab werden angegeben. Objektiv, Okular und Tubuslinse bzw. Tubussystem werden wie bisher schematisch dargestellt und durch ihre Hauptebenenund Brennpunktegekennzeichnet.

Das in den Bildern 2.11a bis c dargestellte schraffierte Strahlenbündel zeigt, wie ein außeraxialer Objektpunkt B abgebildet wird. In der Durchlichtmikroskopie ist es üblich, das Objekt mit einer Beleuchtungseinrichtung zu beleuchten, wobei meistens der Mittenstrahl des beleuchtenden Strahlenkegels parallel zur optischen Achse verläuft. Ebenso verläuft dann der Mittenstrahl des in das Objektiv eintretenden Strahlenbündels, den man auch Hauptstrahl nennt, parallel zur optischen Achse (telezentrischer Strahlenverlauf). Dieser Strahlengang wird zur Veranschaulichung gewählt, weil er auch im praktischen Gebrauch des Mikroskops – zumindest in weitgehender Näherung – sehr häufig vorkommt. In diesem Strahlenbündel ist der im Objektraum achsenparallel verlaufende Hauptstrahl dadurch ausge-

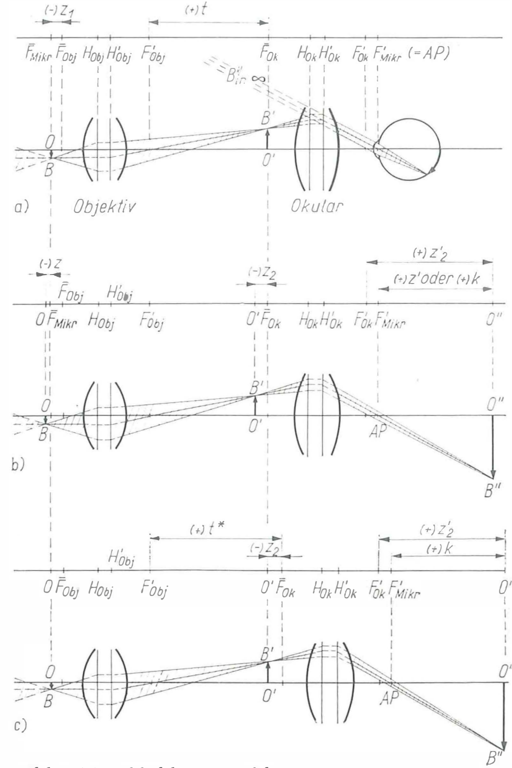


Bild 2.11. Abbildungsstrahlengang im zusammengesetzten Mikroskop bei Mikroskopobjektiven mit endlicher Bildweite

zeichnet, daß er – als Achsenparallelstrahl – durch den bildseitigen Brennpunkt des Objektivs F'_{Obj} und des Gesamtsystems F'_{Mikr} verläuft.

2.2.1. Abbildungsstrahlengang im zusammengesetzten Mikroskop bei Mikroskopobjektiven mit endlicher Bildweite

2.2.1.1. Übliche Anordnung des Mikroskops bei subjektiver Beobachtung

Objektiv und Okular sind so angeordnet, daß das vom Objekt OB (Bild 2.11a) erzeugte Zwischenbild $O'\,B'$ in der vorderen Brennebene des Okulars liegt. Daraus folgt, daß das Strahlenbündel, das die Abbildung von B nach B' vermittelt, das Okular als paralleles Strahlenbündel verläßt. Ein auf unendlich akkommodiertes Auge sieht den außeraxialen Bildpunkt in Richtung B'' liegen, während der axiale Bildpunkt in Richtung der optischen Achse gesehen wird. Die vergrößernde Wirkung des Mikroskops ist durch den Wink e

bestimmt, den das ins Auge einfallende Parallelbündel mit der optischen Achse bildet (s. Abschn. 2.1.7.2.). Entsprechend diesem Winkel entsteht auf der Netzhaut ein Bild. Die Augenpupille fällt mit dem bildseitigen Brennpunkt des Mikroskops F'_{Mikr} zusammen, der der Schnittpunkt aller parallel einfallenden Hauptstrahlen ist, so daß sich an dieser Stelle eine engste Einschnürung ergibt (*AP* des Mikroskops; s. Abschn. 2.3.1.).
Die Vergrößerung des Mikroskops ist nach Gl. (2.21)

$$V_{\text{Mikr}} = \frac{250}{f'_{\text{Mikr}}}.$$

Mit $f'_{\text{Mikr}} = -f'_{\text{Obj}} f'_{\text{Ok}}/t$ nach Gl. (2.25) erhält man

$$V_{\text{Mikr}} = -\frac{250t}{f'_{\text{Obj}} f'_{\text{Ok}}} = -\left(\frac{t}{f'_{\text{Obj}}}\right)\left(\frac{250}{f'_{\text{Ok}}}\right). \quad (2.31)$$

Der erste Faktor ist mit dem Abbildungsmaßstab des Objektivs identisch. Denn nach Gl. (2.8) gilt

$$M_{\text{Obj}} = -\frac{z'_{\text{Obj}}}{f'_{\text{Obj}}},$$

und da das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild $O'\ B'$ mit dem objektseitigen Brennpunkt des Okulars zusammenfällt, erhält man wegen $z'_{\text{Obj}} = F'_{\text{Obj}} O' = F'_{\text{Obj}} \bar{F}_{\text{Ok}} = t$ schließlich

$$M_{\text{Obj}} = -\frac{t}{f'_{\text{Obj}}}.$$

Der zweite Faktor ist nach Gl. (2.21) die Okularvergrößerung

$$V_{\text{Ok}} = \frac{250}{f'_{\text{Ok}}}.$$

Als Vergrößerungsgleichung für das aus Objektiv und Okular zusammengesetzte Mikroskop ergibt sich somit

$$V_{\text{Mikr}} = M_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}}. \quad (2.32)$$

Da sowohl der Abbildungsmaßstab des Objektivs M_{Obj} als auch die Okularvergrößerung V_{Ok} von den Herstellern auf den Objektiven und Okularen gekennzeichnet sind, erhält man die Mikroskopvergrößerung durch einfache Multiplikation dieser Größen.

2.2.1.2. Anordnung des Mikroskops bei virtueller oder reeller Bildlage (Einstellung bei beliebig akkommodiertem bzw. fehlsichtigem Auge, Mikroprojektion, Mikrofotografie)

Vergrößert man den Abstand zwischen Objekt *OB* und Objektiv, so entsteht das Zwischenbild $O'B'$ vor dem vorderen Brennpunkt des Okulars $\bar{F}_{\text{Ok}}$, und man erhält ein reelles Endbild $O''\ B''$ (Bild 2.11 b). Durch eine Fokussierung in der anderen Richtung erhält man ein virtuelles Endbild $O''\ B''$, d.h., das aus dem Okular austretende Strahlenbündel ist divergent, sein Schnittpunkt liegt in seiner rückwärtigen Verlängerung (s. z. B. Bild 2.7a). Aufgrund der Newtonschen Abbildungsgleichung (2.9) läßt sich der Zusammenhang zwischen Bildort und Dingort angeben. Die Objektverschiebung z – gegenüber dem Ausgangsfall der subjektiven Beobachtung mit auf unendliche Bildweite akkommodiertem Auge – steht mit der bildseitigen Größe z' in der Beziehung

$$z = -n \frac{62\,500}{V^2_{\text{Mikr}}} \frac{1}{z'}. \quad (2.33)$$

z' ist die Entfernung *AP* bis zum Bild und damit gleich der Sehweite ($w' = -z'$), in der das Bild aufgrund des Akkommodationszustands des Auges gesehen wird. In der Mikrofotografie wird die Größe z' als optische Kameralänge k bezeichnet.
Umfokussierungen in engen Grenzen sind aufgrund unterschiedlicher Akkommodation nicht vermeidbar. Auch bei der Mikrofotografie oder der Mikroprojektion kann die erforderliche optische Kameralänge durch eine Einstellungsänderung des Mikroskops erreicht werden. Die dabei entstehenden Nachteile (s. Abschn. 8.2.4.2.) können durch spezielle Projektive vermieden werden. Bei subjektiver Beobachtung ist die Vergrößerung des Mikroskops V_{Mikr} unabhängig von der Sehweite w', wenn die Augenpupille in der *AP* des Mikroskops liegt (s. Abschn. 2.1.7.3.). Der Abbildungsmaßstab für die reelle Bildlage mit der optischen Kameralänge k wird durch

$$M = -M_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}} \frac{k}{250}, \quad k \text{ in mm}, \quad (2.34)$$

berechnet.

2.2.1.3. Anordnung des Mikroskops wie bei subjektiver Beobachtung, jedoch anstelle des Auges eine fotografische Kamera

Im Bild 2.11 a kann man sich das Auge durch eine fotografische Kamera ersetzt denken, deren Objektiv auf unendlich eingestellt ist. So läßt sich z. B. mit einer Kleinbildkamera, die man hinter dem Okular anbringt, das mikroskopische Bild fotografieren. Das Zwischenbild $O'B'$ wird durch

das System aus Okular und Fotoobjektiv nach Gl. (2.26) mit dem Abbildungsmaßstab

$$M = -\frac{f'_{\text{Fotoobjektiv}}}{f'_{\text{Ok}}}$$

in der Filmebene der Kamera abgebildet.
Der gesamte Abbildungsmaßstab vom mikroskopischen Objekt bis zur Filmebene beträgt

$$M_{\text{ges}} = M_{\text{Obj}} \left(-\frac{f'_{\text{Fotoobjektiv}}}{f'_{\text{Ok}}}\right)$$

oder mit der Okularvergrößerung $V_{\text{Ok}} = 250/f'_{\text{Ok}}$

$$M_{\text{ges}} = -M_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}} \frac{f'_{\text{Fotoobjektiv}}}{250}, \qquad (2.35)$$

$f'_{\text{Fotoobjektiv}}$ in mm.
Der Quotient

$$p = \frac{f'_{\text{Fotoobjektiv}}}{250} \qquad (2.36)$$

wird als Kamerafaktor bezeichnet.
Die beschriebene fotografische Methode ist in der Mikroskopie nicht üblich, findet jedoch hin und wieder labormäßige Anwendung, wenn man den Bildeindruck in einem für subjektive Beobachtung vorgesehenen Okular fotografisch festhalten möchte. Den parallelen Strahlengang nach dem Okular kann man z. B. mit einem Fernrohr einstellen.

2.2.1.4. Anordnung des Mikroskops mit Projektiven für Mikroprojektion und Mikrofotografie

Für Mikroprojektion und Mikrofotografie werden in Mikroskopen, bei denen aufgrund der Gerätekonstruktion eine feste Entfernung zwischen Zwischenbild $O'B'$ und Endbild $O''B''$ gegeben ist, Projektive benutzt, die für diese Entfernung speziell berechnet sind und deren Sehfeldblende in der Ebene des Zwischenbilds liegt. Das Projektiv wird durch seinen Abbildungsmaßstab M_{Proj} gekennzeichnet, der an die vorgesehene Entfernung $O'O''$ gebunden ist. Abbildungsmaßstab des zusammengesetzten Mikroskops:

$$M = M_{\text{Obj}} M_{\text{Proj}}. \qquad (2.37)$$

2.2.2. Abbildungsstrahlengang im zusammengesetzten Mikroskop bei Mikroskopobjektiven mit unendlicher Bildweite

Die Verwendung von Objektiven mit unendlicher Bildweite erfordert eine nachgeordnete Tubuslinse oder ein Tubussystem, um ein reelles Zwischenbild zu erzeugen (Bild 2.12). Der Vorteil liegt darin, daß zwischen Objektiv und Tubuslinse „paralleler Strahlengang“ herrscht, d. h., für jeden Objektpunkt ist das abbildende Strahlenbündel parallel. Deshalb ist der Abstand zwischen Objektiv und Tubuslinse frei wählbar, ohne hierdurch die Lage des Zwischenbilds bezüglich der Tubuslinse oder die Größe des Zwischenbilds zu beeinflussen.
Ein Einfluß ist allerdings auf den Verlauf der Hauptstrahlen vorhanden. Da die Bildfehler-Korrektion der Okulare und auch die der Tubuslinse vom Verlauf der Hauptstrahlen abhängt, unterliegt die Variabilität des Abstands zwischen Objektiv und Tubuslinse gewissen Beschränkungen.
Dem Mikroskophersteller bieten sich durch die Trennung in Objektiv mit unendlicher Bildweite und Tubuslinse konstruktive Vorteile, die besonders bei komplizierter aufgebauten Mikroskopen ausgenutzt werden (z. B. Universalforschungsmikroskop NU des VEB Carl Zeiss JENA). Für

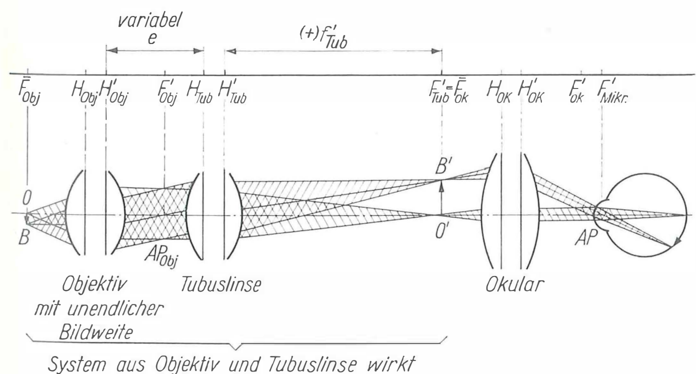


Bild 2.12. Abbildungsstrahlengang im zusammengesetzten Mikroskop bei Mikroskopobjektiven mit unendlicher Bildweite

Auflichtmikroskope werden Objektive mit unendlicher Bildweite verwendet. Die erforderliche Einspiegelung der Auflicht-Beleuchtung erfolgt in dem Bereich des parallelen Strahlengangs zwischen Objektiv und Tubuslinse.

Die Objektive mit unendlicher Bildweite werden durch ihre Vergrößerung V_{Obj} gekennzeichnet. Beispiel: $V_{\mathrm{Obj}} = 50\times$, hieraus folgt die Brennweite $f'_{\mathrm{Obj}} = 250/V_{\mathrm{Obj}} = 5$ mm. Die in den Abschnitten 2.2.1.1. bis 2.2.1.4. angegebenen Gleichungen zur Errechnung der Mikroskopvergrößerung bzw. des Abbildungsmaßstabs können so in Gleichungen umgewandelt werden, die gelten, wenn anstelle eines Objektivs mit endlicher Bildweite ein System aus Objektiv mit unendlicher Bildweite und Tubuslinse benutzt wird. Es ist lediglich der Abbildungsmaßstab des Objektivs mit endlicher Bildweite M_{Obj} zu ersetzen durch M_{Sys}, wobei für den Abbildungsmaßstab M_{Sys} des Systems aus Objektiv mit unendlicher Bildweite und Tubuslinse eine der folgenden Beziehungen zu verwenden ist:

$$M_{\mathrm{Sys}} = -\frac{f'_{\mathrm{Tub}}}{f'_{\mathrm{Obj}}} \tag{2.38a}$$

oder

$$M_{\mathrm{Sys}} = -V_{\mathrm{Obj}}\frac{f'_{\mathrm{Tub}}}{250} \tag{2.38b}$$

oder

$$M_{\mathrm{Sys}} = -V_{\mathrm{Obj}}q_{\infty} \quad \text{mit} \quad q_{\infty} = \frac{f'_{\mathrm{Tub}}}{250} \tag{2.38c}$$

als Tubusfaktor.

Die Gesamtbrennweite des Mikroskops f'_{Mikr}, die bei Verwendung von Objektiven mit endlicher Bildweite durch Gl. (2.25) gegeben ist, wird bei der Anordnung im Bild 2.12 durch die Beziehung

$$f'_{\mathrm{Mikr}} = -\frac{f'_{\mathrm{Obj}}f'_{\mathrm{Ok}}}{f'_{\mathrm{Tub}}} \tag{2.39}$$

bestimmt. Die Brennweite der Tubuslinse f'_{Tub} entspricht der optischen Tubuslänge t. Entsprechend erhält man für die Mikroskopvergrößerung

$$V_{\mathrm{Mikr}} = \frac{250}{f'_{\mathrm{Mikr}}} = -\frac{250\,f'_{\mathrm{Tub}}}{f'_{\mathrm{Obj}}f'_{\mathrm{Ok}}}. \tag{2.40}$$

2.2.3. Betrachtungsvergrößerung, Endvergrößerung, förderliche Vergrößerung

Bei visuellem Gebrauch ist die vergrößernde Wirkung durch die Mikroskopvergrößerung V_{Mikr} eindeutig bestimmt. Bei der Mikrofotografie und der Mikroprojektion entsteht auf einer Auffangebene (Filmebene, Mattscheibe, Projektionsschirm) ein Bild, dessen Größe im Vergleich zum Objekt durch den Abbildungsmaßstab des Mikroskops M gegeben ist. Bei der Mikrofotografie kommt hinzu, daß von dem Negativ eine Kopie oder eine Papiervergrößerung hergestellt wird.

Die Informationskette kann erst dann im Sinne der Mikroskopie als abgeschlossen gelten, wenn die mikrofotografische Aufnahme oder das Projektionsbild betrachtet wird. Je nach der Betrachtungsentfernung erscheinen dem Beobachter Details auf dem Bild oder auch das Gesamtbild unter unterschiedlichem Sehwinkel. Zwischen der Größe eines Objektdetails y, der Betrachtungsentfernung w und der scheinbaren Größe bzw. dem Sehwinkel σ_{P}, unter dem das Objektdetail dem Auge erscheint, besteht die Beziehung $\tan\sigma_{\mathrm{P}} = y/w$ oder $\sigma_{\mathrm{P}} = y/w$ nach Gl. (2.18) oder Gl. (2.18a). Da die scheinbare Größe eines Objektdetails letztlich entscheidend für dessen Erkennbarkeit und für den Größeneindruck ist, unter dem die Objekteinzelheit einem Betrachter erscheint, liegt es nahe, eine Betrachtungsvergrößerung analog der Vergrößerung für ein optisches Gerät gemäß Gl. (2.19) zu definieren, wobei jedoch davon abweichend lediglich scheinbare Größen verglichen werden, die sich durch unterschiedliche Betrachtungsentfernungen ergeben:

Betrachtungsvergrößerung

$$V_{\mathrm{B}} = \frac{\sigma_{\mathrm{P}}}{(\sigma_{\mathrm{P}})_0}, \tag{2.41a}$$

wobei $(\sigma_{\mathrm{P}})_0$ der Sehwinkel ist, unter dem eine betrachtete Objekteinzelheit in der konventionellen Sehweite $w_0 = 250$ mm erscheint. Mit $\sigma_{\mathrm{P}} \approx y/w$ und $(\sigma_{\mathrm{P}})_0 \approx y/w_0 = y/250$ erhält man für die Betrachtungsvergrößerung die Gleichung

$$V_{\mathrm{B}} = \frac{250}{w}, \quad w \text{ in mm}. \tag{2.41b}$$

Nach dieser Definition ist die Betrachtungsvergrößerung gleich Eins, wenn das Objekt oder das Bild aus der konventionellen Sehweite von 250 mm betrachtet wird.

Die Endvergrößerung V, mit der ein Betrachter ein auf einem Schirm projiziertes Bild oder eine mikrofotografische Aufnahme vom Abbildungsmaßstab M sieht, ergibt sich aus dem Produkt dieses Abbildungsmaßstabs und der Betrachtungsvergrößerung.

$$V = MV_{\mathrm{B}} = M\,\frac{250}{w}, \quad w \text{ in mm}. \tag{2.42}$$

Beispiel: Wird das Mikroskop zwecks Erzeugung eines reellen Bilds für Mikrofotografie oder Mikroprojektion umfokussiert (s. Abschn. 2.2.1.2.), so ergibt sich als Abbildungsmaßstab Gl. (2.34)

$$M = -V_{\mathrm{Mikr}} \frac{k}{250}.$$

Betrachtet man das Projektionsbild oder eine Kontaktkopie in der Entfernung w, so erhält man für die Endvergrößerung

$$V = MV_{\mathrm{B}} = -V_{\mathrm{Mikr}} \frac{k}{250} \frac{250}{w} = -V_{\mathrm{Mikr}} \frac{k}{w}. \tag{2.43}$$

Abgesehen von dem unwesentlichen negativen Vorzeichen, ergibt sich die Endvergrößerung als Produkt zweier Faktoren, von denen der erste die Mikroskopvergrößerung bei visuellem Gebrauch des Mikroskops darstellt und der zweite den Einfluß von optischer Kameralänge und Betrachtungsentfernung angibt. Bei einer Mikroprojektion, bei der die Projektionsentfernung ($\approx$ optische Kameralänge k) und die Betrachtungsentfernung w gleich groß sind, wird die Endvergrößerung gleich der Mikroskopvergrößerung bei der üblichen visuellen Benutzung und damit der Größeneindruck in beiden Fällen gleich.

Um die Leistung des Mikroskops hinsichtlich des Auflösungsvermögens voll auszunutzen, ist eine Mindestvergrößerung erforderlich. Andererseits ist es nicht zweckmäßig, die Vergrößerung eines Mikroskops beliebig groß zu wählen, weil oberhalb einer bestimmten Vergrößerung keine weiteren Struktureinzelheiten sichtbar gemacht werden können. Wie im Abschn. 3.2.4. näher erläutert wird, erhält man nach *Abbe* einen Bereich der förderlichen Vergrößerung, der zwischen dem 500- und 1000fachen der numerischen Apertur A des Mikroskopobjektivs liegt. Diese Angabe bezieht sich auf die erläuterte Endvergrößerung V:

$$500\,A \leqq V \leqq 1000\,\mathrm{A}. \tag{2.44}$$

Bei der üblichen visuellen Benutzung eines Mikroskops ist die Vergrößerung des Mikroskops V_{Mikr} mit der Endvergrößerung V identisch. Durch Gl. (2.42) erhält man für den Bereich des förderlichen Abbildungsmaßstabs

$$2wA \leqq M \leqq 4\,wA,\ w \text{ in mm}. \tag{2.44a}$$

Bei der Betrachtung eines Bilds vom Abbildungsmaßstab M in der Entfernung der konventionellen Sehweite $w = w_0 = 250$ mm ergibt sich für den Bereich des förderlichen Abbildungsmaßstabs

$$500\,A \leqq M \leqq 1000\,\mathrm{A}. \tag{2.44b}$$

2.2.4. Übersicht über die wichtigsten Gleichungen für Vergrößerung und Abbildungsmaßstab im zusammengesetzten Mikroskop

(Siehe Tafel auf S. 40)

2.2.5. Funktion des Objektivs und Okulars im zusammengesetzten Mikroskop

Die Vergrößerung V_{Mikr} des zusammengesetzten Mikroskops setzt sich nach Gl. (2.32) aus den Faktoren M_{Obj} und V_{Ok} zusammen. Die Frage, wie der Abbildungsmaßstab des Objektivs und die Okularvergrößerung zweckmäßig zu wählen sind, um die gewünschte Mikroskopvergrößerung zu erhalten, ist offengelassen. Sie ist tatsächlich auch nicht eindeutig zu beantworten. Jedoch können hierzu einige Aussagen gemacht werden, wenn man die Wirkungsweise des Objektivs und des Okulars näher betrachtet. Zu diesem Zweck hat *Abbe* [9] eine gedankliche Zerlegung des Mikroskops durchgeführt, wonach „die sachliche Grenze zwischen Objektiv- und Okularfunktion nicht da zu suchen ist, wo das reelle Bild des Objektivs dem Okular zugeführt wird, sondern vielmehr da, wo im Objektiv divergent eingetretene Strahlenbündel durch wiederholte Brechungen in parallelstrahlige Bündel umgewandelt sind, von wo aus sie durch weitere Brechungen nach dem Okular hin konvergierend gemacht werden". Das Konstruktionsprinzip nach Bild 2.12 entspricht der Abbeschen Zerlegung. Das Objektiv hat vornehmlich die Aufgabe, die Divergenzänderung von Strahlenkegeln großen Öffnungswinkels zu bewirken. „Weil dieser Teil der Leistung vollkommen identisch ist mit demjenigen einer gewöhnlichen Lupe für ein fernsichtiges Auge", kann man ihn „die Lupenwirkung des Objektivs nennen". „Der zweite Teil aber entspricht offenbar... der Wirkung eines Fernrohrs mit kleiner Objektivöffnung." Dabei beruht die spezifische Okularwirkung auf der Richtungsänderung an engen Strahlenbündeln. Kleine Hauptstrahlneigungen werden durch das Okular in große Bildwinkel umgewandelt.

Faßt man nach *Abbe* das zusammengesetzte Mikroskop nach Bild 2.12 als ein Kompositum aus Objektiv und Fernrohr auf, so ist die Mikroskopvergrößerung nach Gl. (2.40) zu zerlegen in

$$V_{\mathrm{Mikr}} = \frac{250}{f'_{\mathrm{Obj}}} \left(-\frac{f'_{\mathrm{Tub}}}{f'_{\mathrm{Ok}}}\right) = V_{\mathrm{Obj}} V_{\mathrm{F}}, \tag{2.45}$$

Gleichung	Gültig für Objektive mit endlicher Bildweite	mit unendlicher Bildweite	Bemerkung
(2.31) (2.40)	$V_{\text{Mikr}} = \frac{250}{f'_{\text{Mikr}}} = -\frac{250t}{f'_{\text{Obj}} f'_{\text{Ok}}}$	$V_{\text{Mikr}} = \frac{250}{f'_{\text{Mikr}}} = -\frac{250 f'_{\text{Tub}}}{f'_{\text{Obj}} f'_{\text{Ok}}}$	Vergrößerung bei subjektiver Beobachtung. Diese Gleichung hat vornehmlich theoretische Bedeutung
(2.32)	$V_{\text{Mikr}} = M_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}}$	$V_{\text{Mikr}} = -V_{\text{Obj}} q_\infty V_{\text{Ok}}$	Vergrößerung bei subjektiver Beobachtung
(2.35)	$M = -M_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}} \frac{f'_{\text{Fotoobj}}}{250}$	$M = V_{\text{Obj}} q_\infty V_{\text{Ok}} \frac{f'_{\text{Fotoobj}}}{250}$	Abbildungsmaßstab bei zusätzlicher Verwendung eines Fotoobjektivs
(2.34)	$M = -M_{\text{Obj}} V_{\text{Ok}} \frac{k}{250}$	$M = V_{\text{Obj}} q_\infty V_{\text{Ok}} \frac{k}{250}$	Abbildungsmaßstab bei umfokussiertem Mikroskop; bei angehobenem Okular näherungsweise gültig
(2.34 a)	$M = -V_{\text{Mikr}} \frac{k}{250}$	$M = -V_{\text{Mikr}} \frac{k}{250}$	
(2.37)	$M = M_{\text{Obj}} M_{\text{Proj}}$	$M = -V_{\text{Obj}} q_\infty M_{\text{Proj}}$	Abbildungsmaßstab bei Verwendung eines Projektivs

Bemerkung:
$q_\infty = \frac{f'_{\text{Tub}}}{250}$ ist der Tubusfaktor
(Näheres im Text von Abschn. 2.2.)

wo V_{Obj} die Vergrößerung des Objektivs und $V_{\text{F}} = -f'_{\text{Tub}}/f'_{\text{Ok}}$ entsprechend Gl. (2.29) die Fernrohrvergrößerung des nachgeordneten Fernrohrs ist, das aus der Tubuslinse als Fernrohrobjektiv und dem Okular besteht.
Diese Zerlegung gestattet auch quantitative Aussagen über die zweckmäßige Aufteilung der Vergrößerung auf Objektiv einerseits und – bei bestimmter Brennweite der Tubuslinse bzw. optischer Tubuslänge – auf das Okular andererseits.
Man nimmt an, daß das Objektiv den auf der optischen Achse gelegenen Objektpunkt O nicht fehlerfrei abbildet. In Abhängigkeit von dem Öffnungswinkel des in das Objektiv eintretenden Strahls soll der aus dem Objektiv austretende Strahl mehr oder weniger von der Parallelität zur optischen Achse abweichen (Öffnungsfehler). Die Abweichung gegen die Parallele zur optischen Achse bzw. zur optischen Achse selbst sei durch den Winkel α bestimmt. Im weiteren Verlauf der Abblidung durch die Tubuslinse ergibt sich infolge dieser Abweichung bei O' keine punktförmige Strahlenvereinigung mehr, sondern eine Zerstreuungsfigur, die mit dem Okular vergrößert gesehen wird. Der Grundgedanke besteht darin, daß die Winkelabweichung α durch das aus Tubuslinse und Okular bestehende Fernrohr dem Auge vergrößert als Winkelabweichung αV_{F} dargeboten wird, wobei das Fernrohr aufgrund seines geringen Öffnungsverhältnisses keinen Beitrag zum Öffnungsfehler liefert. Andererseits ist die Winkelabweichung α bei einem bestimmten Objektivtyp unabhängig von seiner Brennweite. Diese Tatsache wird verständlich, wenn man sich den Objektivtyp mit Strahlengang durch ähnliche Vergrößerung oder Verkleinerung in den linearen Dimensionen und damit in seiner Brennweite verändert vorstellt, wie das Bild eines Dias in unterschiedlicher Projektionsentfernung. Sämtliche Winkel bleiben dabei unverändert erhalten.
Um eine gewünschte Mikroskopvergrößerung V_{Mikr} zu erhalten, ist es am zweckmäßigsten, die durch den Öffnungsfehler bedingte, vom Auge gesehene Winkelabweichung αV_{F} dadurch klein zu halten, daß man die Fernrohrvergrößerung V_{F} oder bei vorgegebener Brennweite der Tubuslinse die Okularvergrößerung V_{Ok} klein wählt und die Lupenvergrößerung des Objektivs V_{Obj} entsprechend groß. Da aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens des Auges die Winkelabwei-

chung $\propto V_F$ nicht mehr stört, wenn sie unterhalb einer gewissen Größe bleibt, ist eine weitere Verkleinerung von V_F nicht erforderlich und schließlich auch von Nachteil. Betrachtet man nämlich außer dem Öffnungsfehler des Achsenpunkts die Feldfehler für außeraxiale Objektpunkte, so führt eine Steigerung der Objektivvergrößerung V_{Obj} bzw. die damit verknüpfte Verringerung der Objektivbrennweite bei gleicher Objektfeldgröße zu stärkeren Feldfehlern, wie Bildfeldwölbung und Astigmatismus. Es ist deshalb mit Rücksicht auf die Feldfehler durchaus nachteilig, die Objektivbrennweite besonders klein zu wählen.
Man sieht also, daß die Achsenfehler des Objektivs möglichst geringe „Übervergrößerung" durch das Fernrohr erfordern, während die Feldfehler des Objektivs geringer gehalten werden können, wenn die Objektivbrennweite groß bzw. die Objektivvergrößerung klein gewählt wird, was eine stärkere Nachvergrößerung des Fernrohrs erfordert, wenn eine gewünschte Mikroskopvergrößerung V_{Mikr} eingehalten werden soll. Nach *Abbe* wird die Fernrohrvergrößerung $V_F = - f'_{Tub}/f'_{Ok}$ bzw. die Größe $-t/f'_{Ok}$ bei Mikroskopen mit Objektiven für endliche Bildweite auch „Übervergrößerung" genannt.
Da sich die Überlegungen auf einen bestimmten Objektivtyp stützen, verlieren sie um so mehr an Wert, je besser es gelingt, Objektive und letztlich auch Okulare so zu berechnen und zu fertigen, daß sie den Forderungen nach hohen Abbildungseigenschaften sowohl hinsichtlich der Achsen- als auch hinsichtlich der Feldfehler gerecht werden. Die Frage, ob es bei einer gewünschten Mikroskopvergrößerung vorteilhaft ist, ein Objektiv hoher oder niedriger Eigenvergrößerung zu wählen, wird dann weitgehend gegenstandslos.

2.3. Strahlenbegrenzung und ihre Meßgrößen

2.3.1. Strahlenraum, Blenden, Pupillen

Nicht die ganze vom Objekt ausgehende Strahlung wird vom Objektiv aufgenommen und dem Auge oder einem anderen Empfänger zugeführt. Durch die begrenzte Ausdehnung der abbildenden Optik und durch Blenden erfolgt eine Begrenzung der von einem Objektpunkt ausgehenden Strahlung in Gestalt eines mehr oder minder geöffneten Strahlenkegels sowie eine Begrenzung der Größe des Objektfelds, das abgebildet wird.

Als Strahlenraum einer optischen Anordnung bezeichnet man den Raum, der von Strahlen durchlaufen wird, die zur Bildentstehung beitragen oder – bei Beleuchtungsoptik – der Objektbeleuchtung dienen. Er wird von Blenden begrenzt, zu denen auch Spiegel- und Linsenfassungen gehören. Ebenso wie ein Objekt von einem optischen System abgebildet wird, werden auch Bilder von den Blenden erzeugt. Eine Besonderheit ergibt sich insofern, als die Blenden häufig inmitten der Systeme angeordnet sind. Die Abbildung erfolgt dann nur durch den Teil des optischen Systems, der sich zwischen der Blende und einem Betrachter befindet. Die Apertur- oder Öffnungsblende und die Feldblende spielen eine besondere Rolle.
Die Apertur- oder Öffnungsblende (*ÖB*) begrenzt den Öffnungswinkel des vom axialen Objektpunkt ausgehenden Strahlenkegels oder – bei Beleuchtungseinrichtungen – des beleuchtenden Strahlenkegels. Ihr Bild erscheint vom axialen Objektpunkt aus gesehen unter dem kleinsten Winkel. Liegt der Objektpunkt im Unendlichen, so begrenzt die Öffnungsblende bzw. deren Bild im Objektraum den Querschnitt des einfallenden Parallelbündels. Die paraxialen Bilder der Öffnungsblende werden Pupillen genannt. Sie können stellvertretend für die real vorhandene Öffnungsblende als öffnungsbegrenzend wirkende Blenden betrachtet werden. Die Eintrittspupille (*EP*) ist das Bild der Öffnungsblende im Objektraum eines optischen Systems. Die Austrittspupille (*AP*) ist das Bild der Öffnungsblende im Bildraum eines optischen Systems. Jedem optischen System können somit eine Eintritts- und Austrittspupille zugeordnet werden, die bezüglich des optischen Systems in einer Ding-Bild-Beziehung stehen, d. h. optisch einander konjugiert sind. Liegt die Öffnungsblende im Objektraum des optischen Systems, ist sie gleichzeitig Eintrittspupille. Eine im Bildraum des optischen Systems angeordnete Öffnungsblende ist gleichzeitig seine Austrittspupille. Liegt die Öffnungsblende inmitten des optischen Systems, so ist das Bild der Öffnungsblende, das durch den vor der Öffnungsblende liegenden Teil des Systems in den Objektraum abgebildet wird, die Eintrittspupille, und in entsprechender Weise ist das Bild der Öffnungsblende, das durch den hinter der Öffnungsblende liegenden Teil des Systems in den Bildraum abgebildet wird, seine Austrittspupille. Der von einem außeraxialen Objektpunkt ausgehende Hauptstrahl, der als Vertreter des gesamten Strahlenbündels angesehen werden kann, verläuft durch die Mitte der Öffnungsblende bzw. der Pupillen. In Strahlen-

gängen, in denen Hauptstrahlen gezeichnet sind, ist somit die Lage der Pupillen leicht zu erkennen.
Die Feldblende (*FB*) ist eine körperliche Blende, die am Ort des Objekts, des Bilds oder eines Zwischenbilds angeordnet ist und das abzubildende Dingfeld begrenzt. Im Mikroskop wirkt bei subjektiver Beobachtung fast immer die sog. Sehfeldblende des Okulars als feldbegrenzende Blende, während in der Mikrofotografie diese Funktion meistens der formatbegrenzenden Blende in der Kamera zukommt. Je nachdem, ob die Feldblende am Dingort oder am Bildort liegt, nennt man sie auch Dingfeldblende oder Bildfeldblende. In Beleuchtungseinrichtungen ist die als Irisblende ausgebildete Leuchtfeldblende die Feldblende, die in die Dingebene des Mikroskops abgebildet wird und das ausgeleuchtete Dingfeld regelt. Das paraxiale Bild einer Feldblende hat man früher Luke genannt. Nach einem Standardentwurf soll es als Sichtfeld bezeichnet werden. Um Verwechslungen vorzubeugen, werden wir nur vom Bild der Feldblende sprechen.
Die Strahlenbegrenzung im Mikroskop mit einer üblichen Beleuchtungseinrichtung wird im Bild 2.13 dargestellt.
Das im Bild 2.13 b gezeichnete Strahlenbündel ist das Bündel der Hauptstrahlen, die als Repräsentanten von abbildenden Strahlenbündeln aufgefaßt werden können und „übrigbleiben", wenn die Öffnung der abbildenden Strahlenbündel durch Schließen der Öffnungsblende gegen Null geht. Das Strahlenbündel der Hauptstrahlen ähnelt deshalb dem Strahlenraum in solchen Bereichen der abbildenden Optik, in denen die Strahlenbündel auch bei offener Aperturblende nur eine geringe Öffnung haben. Das trifft für den Okularbereich zu. Die Aperturblende $ÖB_1$ ist so angeordnet, daß sie im vorderen Brennpunkt des Kondensors liegt. Deshalb verlassen die Hauptstrahlen den Kondensor parallel zur optischen Achse. Das ist gleichbedeutend damit, daß die *AP* des Kondensors im Unendlichen liegt. Ein zur optischen Achse paralleler Verlauf der Hauptstrahlen im Objektraum des Objektivs bedeutet aber auch, daß die *EP* des Objektivs im Unendlichen liegt (s. hierzu auch Bilder 2.11 und 2.12). Die *AP* des Objektivs liegt dann in der bildseitigen Brennebene des Objektivs und ist ein Bild der Öffnungsblende. Diese Betrachtungsweise führt dazu, daß die Austrittspupille des Objektivs nach Lage und Größe eine Funktion der im Beleuchtungsstrahlengang gelegenen Öffnungsblende ist. Die so bestimmte *AP* des Objektivs soll deshalb für eine genauere Kennzeichnung mit einem Index versehen werden, der auf die Abhängigkeit von der Beleuchtung hinweist: $AP_{\mathrm{Obj,\,Bel}}$. Im weiteren Strahlenverlauf wirkt diese Pupille als *EP* des Okulars, durch dessen Abbildung schließlich die

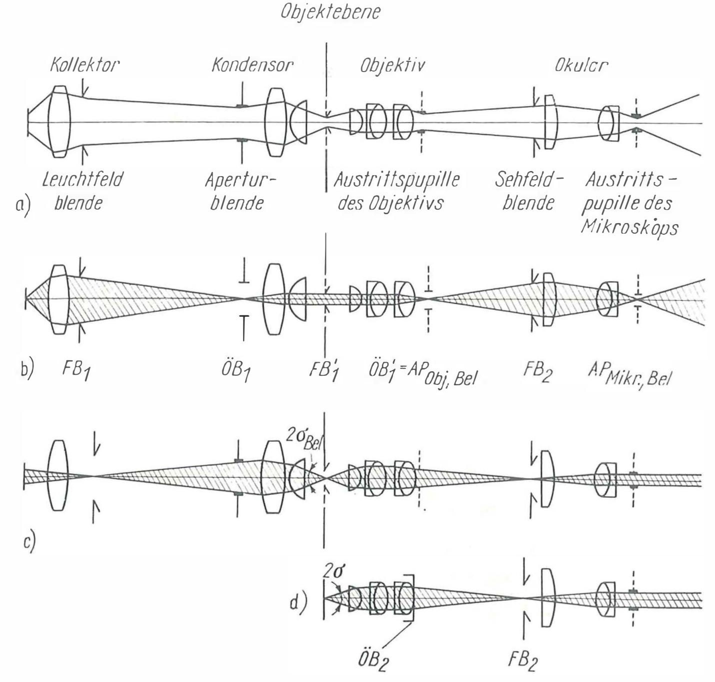


Bild 2.13
Strahlenbegrenzung im Mikroskop
a) Strahlenraum, begrenzt durch Leuchtfeldblende und Aperturblende der Köhlerschen Beleuchtungseinrichtung;
b) Strahlengang bei nahezu geschlossener Aperturblende, veranschaulicht die Feldbegrenzung;
c) Strahlengang bei nahezu geschlossener Leuchtfeldblende, veranschaulicht die Begrenzung des Öffnungsbündels durch die Aperturblende;
d) Strahlenbegrenzung des Öffnungsbündels durch eine begrenzende Öffnung im Objektiv

AP des Okulars entsteht, die mit der Austrittspupille des Mikroskops $AP_{\text{Mikr, Bel}}$ übereinstimmt.

Die Austrittspupille des Mikroskops ist als eine enge kreisförmige Einschnürung (auch Ramsdenscher Kreis genannt) im bildseitigen Strahlenraum des Mikroskops oberhalb des Okulars sichtbar, wenn man eine Mattscheibe oder einen ähnlich wirkenden Gegenstand in den Strahlenraum bringt. Bei subjektiver Beobachtung soll die Augenpupille am Ort der Austrittspupille des Mikroskops liegen. Liegt die Augenpupille zu weit von der Austrittspupille des Mikroskops entfernt, so können nicht sämtliche Hauptstrahlen in die Augenpupille eintreten, was zu unerwünschter Begrenzung des Felds führt.

Den Strahlenverlauf nach Bild 2.13c erhält man, wenn die Aperturblende geöffnet, die Feldblende dagegen nahezu geschlossen wird. Er charakterisiert die Strahlenbegrenzung des Öffnungsbündels für einen Achsenpunkt. Strahlen dieses Bündels heißen Öffnungsstrahlen. Das Öffnungsbündel ähnelt dem Strahlenraum in solchen Bereichen der abbildenden Optik, in denen Öffnungsbündel große Apertur haben und das Feld klein ist. Das trifft fast immer auf den Objektivbereich zu.

Auf eine Besonderheit in der Strahlenbegrenzung des Öffnungsbündels ist hinzuweisen. Nach Bild 2.13c hängt der Öffnungswinkel des in das Objektiv eintretenden Strahlenkegels, der die direkte Fortsetzung des beleuchtenden Strahlenkegels mit dem Öffnungswinkel $2\sigma_{\text{Bel}}$ ist, und der Durchmesser der *AP* des Objektivs von der Größe der Aperturblende $\ddot{O}B_1$ ab und ist mit ihr veränderlich. Die *AP* des Objektivs – und somit auch die *AP* des Mikroskops – ist eine Funktion der Beleuchtungsapertur und keineswegs eine unveränderliche Eigenschaft des Objektivs. Für Fragen der Bildhelligkeit ist diese Auffassung zutreffend und im allgemeinen ausreichend. Für Fragen der Auflösung von Objektstrukturen sowie für die Bildentstehung ist jedoch die durch das Objektiv bedingte Begrenzung des Öffnungsbündels maßgeblich. Meist ist es der Rand einer Linsenfassung, der als Öffnungsblende den maximal möglichen Öffnungswinkel des vom Objektiv aufnehmbaren Strahlenkegels festlegt. Dieser bzw. sein im Bildraum des Objektivs entstehendes Bild ist gleichzeitig die Austrittspupille des Objektivs. Diese so bestimmte Austrittspupille des Objektivs ist eine feste, unveränderliche Eigenschaft des Objektivs, wenn noch die bei richtiger Benutzung des Mikroskopobjektivs zutreffende Voraussetzung gemacht wird, daß das Objekt einen festen Abstand vom Objektiv hat. Die Konstruktion der Mikroskopobjektive ist häufig so ausgeführt, daß diese Austrittspupille des Objektivs in der Nähe des Aperturblendenbilds $\ddot{O}B_1'$ liegt. Entfernt man das Okular und blickt mit bloßem Auge in den Mikroskoptubus hinein, so sieht man die Austrittspupille des Objektivs und das Aperturblendenbild, das im obigen Sinne als $AP_{\text{Obj, Bel}}$ aufzufassen ist, mehr oder weniger gleichzeitig scharf.

2.3.2. Meßgrößen der Öffnung

2.3.2.1. Numerische Apertur

Sowohl für fotometrische Betrachtungen als auch für Fragen der mikroskopischen Bildentstehung, besonders für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops, ist nicht der Öffnungswinkel 2σ, sondern die von *Abbe* eingeführte numerische Apertur

$$A = n \sin \sigma \tag{2.46}$$

maßgeblich. Sie ist das Produkt aus der Brechzahl und dem Sinus des halben Öffnungswinkels im Objektraum eines optischen Systems. Eine bildseitige numerische Apertur kann als

$$A' = n' \sin \sigma' \tag{2.46a}$$

definiert werden. Wenn keine Mißverständnisse möglich sind, wird häufig anstelle von der numerischen Apertur kürzer von der Apertur eines optischen Systems gesprochen.

Bei normal benutzten, vergrößernd wirkenden Mikroskopobjektiven gilt für die Brechzahl im Bildraum immer $n' = 1$, während im Objektraum sowohl $n = 1$ („Trockensystem") als auch $n \neq 1$ („Immersionsobjektiv") vorkommt. Im letzteren Fall ist n die Brechzahl der Immersionsflüssigkeit. Für ein Trockensystem ergibt sich für $\sigma = 90°$ als obere Grenze der numerischen Apertur $A = 1$.

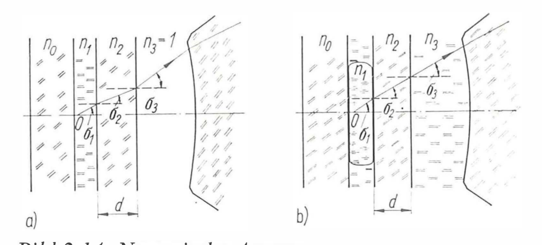


Bild 2.14. Numerische Apertur

Strahlengang im Objektbereich eines Mikroskopobjektivs bei bedeckten Präparaten

In der Praxis erreicht man $A = 0{,}95$. Die numerische Apertur wird zur Kennzeichnung eines Mikroskopobjektivs aufgraviert oder anders markiert.
Die numerische Apertur ist gegenüber Brechungen an Planflächen eine invariante Größe, d.h., das Produkt $n \sin \sigma$ ändert seinen Wert nicht, wenn der zugehörige Öffnungsstrahl von einem durch eine Planfläche begrenzten Medium in ein anderes übergeht. Das folgt unmittelbar aus dem Brechungsgesetz, wonach gilt

$$n_1 \sin \sigma_1 = n_2 \sin \sigma_2 = \ldots = n_k \sin \sigma_k.$$

Wie im Bild 2.14a und b dargestellt, durchläuft der vom Objektpunkt 0 ausgehende Öffnungsstrahl drei Medien und erfährt zwei Brechungen an Planflächen, bevor er in das Objektiv eintritt. Für ein isoliertes Objektdetail ist n_1 die Brechzahl des Einbettungsmediums (Bild 2.14a), für eine Objekteinzelheit in einem ausgedehnten Objekt die des Objekts (Bild 2.14b), n_2 die Brechzahl des Deckglases, n_3 die des Mediums zwischen Deckglas und Objektiv (Luft oder Immersionsflüssigkeit), n_0 die des Objektträgers, der hier nur der Vollständigkeit halber mit gezeichnet wurde, obwohl er nicht vom Öffnungsstrahl durchlaufen wird. Die Angabe der numerischen Apertur bezieht sich auf den halben Öffnungswinkel und die Brechzahl in dem Medium, das unmittelbar vor der Frontlinse des Objektivs liegt; im Beispiel $A = n_3 \sin \sigma_3$. Aufgrund der Invarianzeigenschaft der numerischen Apertur gilt für das Produkt $n_1 \sin \sigma_1$ der gleiche Wert A. In Gleichungen, in die die Brechzahl des Objektraums eingeht, ist im Sinne von Bild 2.14a und b die Brechzahl n_1 einzusetzen und nicht die der Immersionsflüssigkeit.

2.3.2.2. Öffnungsverhältnis

Für parallel in ein optisches System einfallende Strahlenbündel verwendet man als Maß für die fotometrisch wirksame Öffnung das Öffnungsverhältnis (auch relative Öffnung genannt)

$$\Omega = \frac{2h}{f'}, \qquad (2.47)$$

wobei $2h$ der Durchmesser der Eintrittspupille und f' die Brennweite des optischen Systems ist. Der Kehrwert des Öffnungsverhältnisses ist die Öffnungszahl oder Blendenzahl k $(= 1/\Omega)$. Zur Kennzeichnung fotografischer Objektive, auch lupenfotografischer Objektive für einstufige Mikrofotografie, wird außer der Brennweite f das Öffnungsverhältnis in der Form $1 : k$ (z.B. $1 : 2{,}8$) oder die Blendenzahl k (z.B. 2,8) angegeben. In der englischen Literatur heißt die Blendenzahl focal ratio oder f value, und man spricht in dem Beispiel von einem $f/2{,}8$-Objektiv.

2.3.2.3. Zusammenhang zwischen numerischer Apertur und Öffnungsverhältnis

Zwischen Öffnungsverhältnis Ω und numerischer Apertur A besteht ein sehr einfacher Zusammenhang, wenn ein optisches System von der Brennweite f' betrachtet wird, bei dem ein paralleles Strahlenbündel mit Dmr. $2h$ ein- oder austritt (s. z.B. Bild 2.1a und b). In diesem Fall gilt

$$A = \frac{\Omega}{2}, \qquad (2.48)$$

wobei A als bildseitige oder objektseitige numerische Apertur aufzufassen ist. Diese Beziehung erhält man unmittelbar aus der Sinusbedingung $f' = h/\sin \sigma'$, die man bei abbildenden Systemen als weitgehend erfüllt annehmen kann.
In dem Fall, daß Objekt- und Bildpunkt im Endlichen liegen (s. z.B. Bild 2.1c) und die Abbildung mit dem Abbildungsmaßstab M erfolgt, kann die wirksame (objektseitige) numerische Apertur aus dem Öffnungsverhältnis aus folgender Beziehung erhalten werden:

$$A = \frac{\Omega}{2} \, \frac{1}{1 + (1/M)}. \qquad (2.48a)$$

Diese Beziehung gilt unter Voraussetzungen, die bei mikrofotografischen Objektiven weitgehend erfüllt sind: Erfüllung der Sinusbedingung, Austrittspupille in der Nähe der Bildhauptebene bzw. in Systemnähe. Für eine $1 : 1$-Abbildung ergibt sich z.B. $A = \Omega/4$.

2.3.2.4. Zusammenhang zwischen numerischer Apertur und Durchmesser der Austrittspupille

Bei einem zusammengesetzten Mikroskop verläßt das von einem Objektpunkt ausgehende Strahlenbündel von der numerischen Apertur $A = n \sin \sigma$ das Okular als paralleles Strahlenbündel mit $\varnothing_{\mathrm{AP}}$ (s. Bild 2.13c und d).
Zwischen beiden Größen besteht ein einfacher Zusammenhang, der sich aus dem vorstehenden leicht herleiten läßt. Nach Gl. (2.48) und der Bedeutung des Öffnungsverhältnisses beim zusammengesetzten Mikroskop

$$\Omega = \frac{2h}{f'_{\mathrm{Mikr}}} = \frac{\varnothing_{\mathrm{AP}}}{f'_{\mathrm{Mikr}}}$$

erhält man

$$A = \frac{1}{2} \frac{\varnothing_{AP}}{f'_{Mikr}}.$$

Setzt man hierin noch die Gleichung für die Mikroskopvergrößerung nach Gl. (2.21) $V'_{Mikr} = 250/f'_{Mikr}$ ein, so ergibt sich für den Durchmesser der Austrittspupille

$$\varnothing_{AP} = \frac{500\,A}{V_{Mikr}}. \tag{2.49}$$

Beträgt die Mikroskopvergrößerung das 500fache der numerischen Apertur ($V_{Mikr} = 500\,A$), so hat die Austrittspupille des Mikroskops einen Dmr. von 1 mm. Man bezeichnet diese Vergrößerung auch als Normalvergrößerung des Mikroskops. Bezieht man sich auf den Bereich der förderlichen Vergrößerung, der nach Gl. (2.44) zwischen dem 500- und 1000fachen der Objektivapertur angenommen wird, so beträgt der Durchmesser der Austrittspupille an der unteren Grenze der förderlichen Vergrößerung 1 mm und an deren oberen Grenze 0,5 mm.

Man erkennt hieraus, daß beim Mikroskopieren mit üblichen Vergrößerungen die Austrittspupille des Mikroskops immer kleiner als die Augenpupille sein wird, die somit ihrerseits nicht strahlenbegrenzend wirkt. Man erkennt weiterhin, daß bei Vergrößerungen, die den Bereich der förderlichen Vergrößerung überschreiten, die Austrittspupille und damit der Querschnitt der ins Auge eintretenden abbildenden Strahlenbündel so klein werden, daß sich feine Inhomogenitäten des Auges störend auswirken (entoptische Erscheinungen). Ebenso wirken Staubteilchen im Okularbereich um so störender, je kleiner der Durchmesser der Austrittspupille ist.

Setzt man in Gl. (2.49) für A die Beleuchtungsapertur A_{Bel} ein, so erhält man den Durchmesser von $AP_{Mikr,\,Bel}$.

2.3.3. Meßgrößen des Felds

Der Ausschnitt des Präparats, der im Mikroskop abgebildet wird, ist das Dingfeld, das bei subjektiver Beobachtung durch die Feldblende des Okulars begrenzt wird. Der wirksame Durchmesser der Feldblende wird als Feldzahl bezeichnet und sei $2y'$. Der Durchmesser des Dingfelds $2y$ ergibt sich für Objektive mit endlicher Bildweite aus

$$2y = \frac{2y'}{M_{Obj}} \tag{2.50a}$$

und für Objektive mit unendlicher Bildweite, denen eine Tubuslinse mit einem Tubusfaktor q_∞ nachgeordnet ist, aus

$$2y = \frac{2y'}{V_{Obj}q_\infty}. \tag{2.50b}$$

Die Feldzahl kann auch dazu dienen, die scheinbare Größe $2\sigma'_p$ zu bestimmen, unter der das im Mikroskop sichtbare Bild dem Auge erscheint. In diesem Zusammenhang nennt man σ'_p auch den (halben) Bildfeldwinkel oder kürzer den (halben) Bildwinkel. Es besteht in Anwendung von Gl. (2.5) die Beziehung

$$\tan \sigma'_p = \frac{y'}{f'_{Ok}} = \frac{V_{Ok}y'}{250}. \tag{2.51}$$

2.4. Wellenoptische und aberrationsbehaftete Abbildung

Die bisher behandelte Abbildung durch optische Systeme und durch das Mikroskop, in deren Rahmen eine Anzahl wichtiger Begriffe eingeführt und erläutert wurden, gründet sich fast ausschließlich auf die Vorstellungen der Gaußschen Abbildungstheorie, die einerseits mit der Fiktion des Strahls auskommt und andererseits strenge Gültigkeit nur dann hat, wenn die Öffnungswinkel der abbildenden Strahlenbündel und die Neigungswinkel der Hauptstrahlen gegen die optische Achse genügend klein sind. Bei der Betrachtung der Strahlenbegrenzung wurden Meßgrößen für die Öffnung und des Felds eingeführt, die einer solchen Beschränkung nicht mehr unterliegen. Weitgeöffnete Bündel, wie sie bei der Abbildung durch ein Mikroskopobjektiv vorherrschen, und stark geneigte Hauptstrahlen, wie sie im Okularbereich anzutreffen sind, führen zu Bildfehlern bei der mikroskopischen Abbildung. Man kann hierbei sowohl die strahlenoptische als auch die wellenoptische Betrachtung anwenden. Beide stehen in engem Zusammenhang, so daß es vorteilhaft erscheint, je nach dem Grad der Schwierigkeit der zu erläuternden Sache entweder die strahlenoptische oder die wellenoptische Betrachtung in den Vordergrund zu stellen.

Grundsätzlich ist die wellenoptische Behandlung eines Abbildungsproblems aussagekräftiger als die strahlenoptische oder, was dasselbe bedeutet, die geometrisch-optische Behandlung, die mit der Fiktion von Lichtstrahlen operiert. Der Grund liegt darin, daß das Licht, das die Abbildung ver-

mittelt, eine Wellenerscheinung ist. Auf die physikalischen Eigenschaften des Lichts wird im Abschn. 3 eingegangen. Einige wesentliche Merkmale aus der Wellenoptik werden vorweggenommen, um das Verständnis der wellenoptischen Abbildung im Mikroskop zu ermöglichen, die in diesem Abschnitt unter dem Aspekt der Bildfehler und Bildfehlertoleranzen behandelt wird. Zur Einführung dient die wellenoptische Abbildung eines aberrationsfreien Systems.

2.4.1. Wellenoptische Abbildung eines leuchtenden Punkts

Als mikroskopisches Objekt betrachtet man einen leuchtenden Punkt. Er kann durch eine kleine Öffnung in einer auf einen Glasobjektträger aufgebrachten dünnen Metallschicht realisiert werden, wobei der Durchmesser der Öffnung unterhalb der Auflösungsgrenze des Mikroskops liegen möge. Ein solches Präparat eignet sich vorzüglich als Testpräparat und wird kurz als Sterntest bezeichnet. Wird dieses Testpräparat durch die Beleuchtungseinrichtung des Mikroskops beleuchtet, so entsteht durch die Abbildung im Mikroskop ein Bild des leuchtenden Punkts, das wie ein Stern auf dunklem Hintergrund erscheint. Nach der geometrisch-optischen Vorstellung müßte das Sternbild bei aberrationsfreier Abbildung punktförmig erscheinen, weil dem vom Objektpunkt O ausgehenden Strahlenkegel bildseitig ein konzentrisches Strahlenbündel entspricht, das sich in einem Punkt O' vereinigt (Bild 2.15). In Wirklichkeit ist das Bild eines leuchtenden Punkts eine Beugungsfigur, die aus einem hellen zentralen Scheibchen besteht, das von abwechselnd dunklen und hellen Ringen umgeben ist, deren Helligkeit nach außen hin stark abnimmt (Bild 2.16).

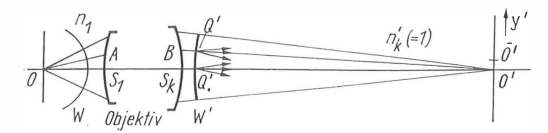


Bild 2.15. Wellenoptische Abbildung eines leuchtenden Punkts

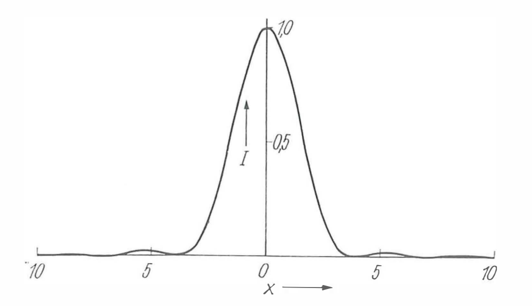


Bild 2.16. Intensitätsverlauf in der Beugungsfigur einer punktförmigen Lichtquelle bei kreisförmiger Pupille und aberrationsfreier Abbildung (Airysche Beugungsfigur)

Die Erklärung dieses Sachverhalts soll kurz umrissen werden. Der im strahlenoptischen Sinne punktförmig erfolgenden Abbildung durch das Objektiv können sowohl im Objektraum als auch im Bildraum Wellenflächen zugeordnet werden, die Kugelflächen sind und sich im Bild 2.15 als Kreise W bzw. W' mit O bzw. O' als Mittelpunkt darstellen. Die Wellenflächen kann man sich als Wellenfronten vorstellen, die bei der Ausbreitung einer Lichterregung von einer Punktlichtquelle aus entstehen. Sie sind Flächen gleichen Schwingungszustands des Lichts oder Flächen gleicher Phase. Der zeitliche Aspekt, der dieser Vorstellung zugrunde liegt, kann durch einen räumlichen ersetzt werden, wenn man den Begriff der optischen Weglänge oder des Lichtwegs einführt. Die optische Weglänge ist das Produkt aus dem geometrischen Weg und der Brechzahl des Mediums, in dem der Weg verläuft. Erreicht das von O ausgehende Licht nach Durchgang durch verschiedene Medien einen Punkt, z. B. den Punkt Q' auf der Wellenfläche W', so setzt sich die optische Weglänge von O nach Q' aus mehreren Teilstücken zusammen. Im Objektraum beträgt die optische Weglänge $n_1\overline{OA}$, im Bildraum $n_k'\overline{BQ'}$, und im Innern des optischen Systems kommen je nach der Anzahl der Linsen und Luftabstände mehrere Teilstücke des optischen Weges hinzu, die längs des Strahls zu messen sind, der bei A in das optische System eintritt und es bei B verläßt. Es gilt, daß in einer gegebenen Zeit eine Lichterregung immer den gleichen optischen Weg durchläuft.

Dieser Zusammenhang ist einleuchtend, wenn man beachtet, daß erstens die Brechzahl n eines Mediums definiert ist als das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit c_0 im Vakuum zur Lichtgeschwindigkeit c im Medium ($n = c_0/c$) und daß zweitens zwischen dem geometrischen Weg s und der Zeit t die Beziehung $s = ct$ besteht, woraus für die optische Weglänge $ns = (c_0/c)\,s = c_0 t$ folgt, d. h., bis auf die Konstante c_0 ist die optische Weglänge mit der dazu benötigten Zeit gleich. Somit ist der optische Weg, den das Licht

von einer Punktlichtquelle bis zu einer zugehörigen Wellenfläche zurücklegt, eine Größe, die unabhängig von dem betrachteten Punkt auf der Wellenfläche ist.

Nach dem Huygensschen Prinzip wirken sämtliche Punkte auf einer Wellenfläche als Ausgangspunkte von Elementarwellen, die man aufgrund der Eigenschaft der Wellenfläche als Fläche gleichen Schwingungszustands auch als gleichphasige Schwingungszentren auffassen kann. Im Bild 2.15 sind z.B. zwei Schwingungszentren Q' und Q'_0 dargestellt. Im Bildpunkt O' treffen die Elementarwellen von allen Punkten der Wellenfläche W' mit gleicher Phase ein; denn die optische Weglänge und damit die Zeitdauer des Lichts von W' nach O' sind für alle Punkte der Wellenfläche gleich. Die Überlagerung dieser Elementarwellen in O' führt zu maximaler Helligkeit. Betrachtet man einen in der Umgebung von O' liegenden Punkt $\bar{O}'$, so sind die Entfernungen und damit die optischen Weglängen von den Punkten der Wellenfläche W' bis zu $\bar{O}'$ nicht mehr gleich groß. Die bei $\bar{O}'$ eintreffenden Elementarwellen sind nicht mehr gleichphasig, sondern unterscheiden sich in ihrem Schwingungszustand, so daß durch Überlagerung (Interferenz) der Elementarwellen die Helligkeit in $\bar{O}'$ kleiner als in O' ist. Die theoretische Intensitätsverteilung ist im Bild 2.16 wiedergegeben.

2.4.1.1. Beugungsfigur bei kreisförmiger Pupille

Die theoretische Intensitätsverteilung in der Beugungsfigur erhält man durch Anwendung der Kirchhoffschen Formel auf die Beugung an einer kreisförmigen Öffnung, die durch die Rotationssymmetrie des optischen Systems bedingt ist. Es handelt sich hierbei um eine Integration über die Elementarbereiche der Wellenfläche. Als Resultat erhält man für die Amplitude in der Auffangebene die Funktion

$$A_1(x) = \frac{2J_1(x)}{x},$$

die so normiert ist, daß sich für das Zentrum der Beugungsfigur an der Stelle $x = 0$ die Amplitude $A_1(O) = 1$ ergibt. Die Funktion $A_1(x)$ ist z.B. in [26] tabelliert. Die Funktion $J_1(x)$ ist die Besselsche Funktion 1. Ordnung. Da die Intensität dem Quadrat der Amplitude proportional ist, ergibt sich für die Intensität

$$I(x) = [A_1(x)]^2, \tag{2.52}$$

wenn man festlegt, daß für das Zentrum der Beugungsfigur die Intensität $I(O) = 1$ bzw. 100% sei. Im Bild 2.18 ist der Verlauf der Intensität dargestellt. Um den räumlichen Intensitätsverlauf (das Lichtgebirge) zu erhalten, hat man sich die Funktionskurve $I(x)$ um die Ordinatenachse rotiert zu denken. Die Nullstellen der Funktion liegen bei $x = 3{,}83;\ 7{,}02;\ 10{,}17;\ \ldots$ Sie entsprechen den Radien der dunklen Ringe der Beugungsfigur. Zwischen der Variablen x, die eine dimensionslose Größe ist, und dem Radius y' der Beugungsfigur in der bildseitigen Auffangebene eines abbildenden optischen Systems besteht der Zusammenhang

$$x = \frac{2\pi}{\lambda} A'y' \tag{2.53}$$

oder

$$y' = \frac{1}{2\pi}\, x \frac{\lambda}{A'} = \frac{1}{2\pi}\, x \frac{\lambda}{A} M,$$

wobei noch davon Gebrauch gemacht wurde, daß aufgrund der Sinusbedingung (s. Abschn. 2.4.3.) für die bildseitige numerische Apertur $A' = A/M$ mit M als Abbildungsmaßstab gilt. Für $x = 3{,}83$ ist der Radius des zentralen Beugungsscheibchens

$$y' = 0{,}61 \frac{\lambda}{A} M. \tag{2.54a}$$

Denkt man sich das in der Bildebene entstehende Beugungsscheibchen in die Objektebene zurückprojiziert, so erhält man wegen $y = y'/M$ für den Radius des auf die Objektebene bezogenen Beugungsscheibchens

$$y = 0{,}61 \frac{\lambda}{A}. \tag{2.54b}$$

Der Durchmesser $d = 2y$ ist somit außer von der Wellenlänge nur noch von der numerischen Apertur des Objektivs abhängig und ist um so kleiner, je größer die Apertur wird. Im Bildraum ist der Durchmesser $d' = 2y'$ des Beugungsscheibchens nach Gl. (2.54a) um den Faktor des Abbildungsmaßstabs M größer. An den Grenzen der förderlichen Vergrößerung oder des entsprechenden Abbildungsmaßstabs des Mikroskops bei $M = 500\,A$ bzw. $M = 1000\,A$ ist der Durchmesser für die mittlere Wellenlänge $\lambda = 550$ nm $d' = 0{,}34$ mm bzw. $d' = 0{,}67$ mm.

Nach der Definition des mikroskopischen Auflösungsvermögens, wonach zwei leuchtende Punkte im Mikroskop gerade noch getrennt wahrgenommen werden, wenn das Zentrum des einen Beu-

gungsscheibchens auf das erste Minimum bzw. den ersten dunklen Ring des zweiten Beugungsscheibchens fällt, ist durch Gl. (2.54b) auch die Auflösungsgrenze des Mikroskops für zwei leuchtende Punkte gegeben.
Die Auflösungsgrenze des Mikroskops ist nicht zu verwechseln mit der Grenze der Erkennbarkeit eines lichtaussendenden Objektdetails (helles Scheibchen) in einem dunklen Umfeld. Für den Radius eines scheibchenförmigen hellen Objekts ist keine Grenze gesetzt. Die Erkennbarkeit eines kleinen hellen Scheibchens in dunklem Umfeld hängt nur von seiner Leuchtdichte bzw. von der Beleuchtungsstärke ab, mit der es beleuchtet wird. Die Grenze der Erkennbarkeit ist dann erreicht, wenn sich die Intensität der Beugungsfigur vom Umfeld, das aufgrund von Streulicht immer ein gewisses Intensitätsniveau hat, nicht mehr erkennbar unterscheidet.

2.4.1.2. Beugungsfigur bei ringförmiger Pupille

Die Gestalt der Beugungsfigur, die bei einer optischen Abbildung entsteht, ist von der Gestalt der die Öffnung begrenzenden Pupille abhängig. Bei Spiegelobjektiven treten ringförmige Pupillen auf,

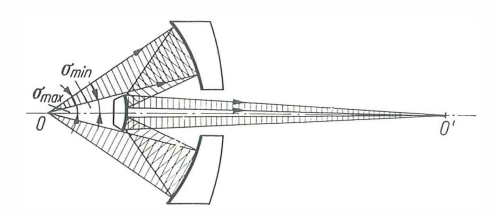


Bild 2.17. Strahlengang bei einem Spiegelobjektiv nach dem Schwarzschildschen Typ
Diese Objektive haben eine Zentralabschattung, dadurch entsteht eine Ringpupille

die aufgrund ihres Aufbaus (s. Abschn. 2.5.3.) aus dem abbildenden Strahlenkegel eines Objektpunkts einen mittleren Teil ausblenden (Bild 2.17). Die Objektive haben eine Zentralabschattung, die als das Verhältnis der inneren (minimalen) numerischen Apertur $A_{\min} = n \sin \sigma_{\min}$ zur äußeren (maximalen) numerischen Apertur $A_{\max} = n \sin \sigma_{\max}$ definiert ist:

$$\text{(lineare) Zentralabschattung } \varrho = \frac{A_{\min}}{A_{\max}}. \qquad (2.55)$$

Die Beugungsfigur bei Objektiven mit ringförmiger Pupille ist rotationssymmetrisch wie die Beugungsfigur bei Objektiven mit kreisförmiger Pupille, jedoch ist ihr Intensitätsverlauf von der Zentralabschattung ϱ abhängig. Die Intensität $I(x)$ im „Abstand" x vom Zentrum der Beugungsfigur beträgt

$$I(x) = \frac{1}{1-\varrho^2}\,[\Lambda_1(x) - \varrho^2 \Lambda_1(\varrho x)]^2, \qquad (2.56)$$

wobei $\Lambda_1(x)$ die im Abschn. 2.4.1.1. eingeführte Funktion ist und ferner die Voraussetzung gilt, daß der gesamte Lichtstrom, der von einem Objektpunkt ausgeht, unabhängig von der Zentralabschattung zu 1 oder 100% führt. Das bedeutet, daß jede Beugungsfigur in ihrer gesamten Ausdehnung unabhängig von der Zentralabschattung den gleichen Gesamtlichtstrom erhält. Der Lichtverlust bei einem zentralabgeschatteten Objektiv im Vergleich zu einem Objektiv ohne Zentralabschattung – jedoch von gleicher (äußerer) numerischer Apertur – ist ohne Bedeutung, weil bei der mikroskopischen Beobachtung die Helligkeit durch die Beleuchtungseinrichtung einschließlich der Dämpfungsfilter in weiten Grenzen reguliert werden kann, so daß die genannte Voraussetzung jederzeit realisierbar ist. Im Zentrum der Beugungsfigur an der Stelle $x = 0$ beträgt nach Gl. (2.56) die Intensität

$$I = 1 - \varrho^2. \qquad (2.56a)$$

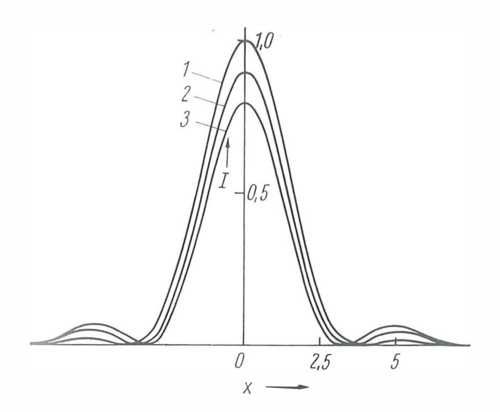
Der Intensitätsverlauf in der Beugungsfigur in Abhängigkeit von der Zentralabschattung ist im Bild 2.18 grafisch dargestellt. Die konkrete Bedeutung der Abszisse x für die mikroskopische Abbildung folgt aus Gl. (2.53). In Tafel 2.2 ist die Intensität im Zentrum und an den Stellen der

Tafel 2.2. Angaben zum Intensitätsverlauf in der Beugungsfigur eines abbildenden Systems mit Zentralabschattung

Zentralabschattung ϱ	0	0,2	0,3	0,4	0,32	0,35	0,45
Größe der abgeschatteten Pupillenfläche %	0	4	9	16	10,2	12,2	20,3
Intensität % im Zentrum	97	96	91	84	90	88	80
Intensität % im 1. Maximum	1,75	2,92	4,32	5,93	4,72	5,14	6,66
Intensität % im 2. Maximum	0,42	0,14	0,10	0,28	0,11	0,15	0,54

Maxima der ersten zwei Beugungsringe für verschiedene Zentralabschattungen sowie für ein abbildendes System ohne Zentralabschattung, das als Vergleichsfall gilt, in Prozent angegeben. Die Angaben für $\varrho = 0{,}32$; $0{,}35$; $0{,}45$ beziehen sich auf einige industriell gefertigte Objektive.

Man erkennt, daß die Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens bei größer werdender Zentralabschattung abnimmt und dafür die Intensität vor allem des ersten Beugungsrings zunimmt. Abnahme der Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens und Zunahme der Intensität außerhalb des zentralen Beugungsscheibchens treten in ähnlicher Art auch dann auf, wenn die Abbildung durch ein Objektiv nicht mehr fehlerfrei, sondern mit Bildfehlern behaftet ist, z. B. mit dem Öffnungsfehler, den bis zu einem gewissen Grad jedes Mikroskopobjektiv aufweist. Die Wirkung einer Zentralabschattung kann in diesem Sinne wie die Wirkung eines Bildfehlers aufgefaßt werden, und es kommt für die Güte der Abbildung nur darauf an, ob die Zentralabschattung innerhalb einer zulässigen Toleranz liegt. Nach dem im Abschn. 2.4.3.1. behandelten Kriterium der Definitionshelligkeit darf die Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens auf 0,8 bzw. 80% der Intensität abfallen, die im Zentrum des Beugungsscheibchens eines fehlerfreien und zentralabschattungsfreien – idealen – Objektivs gleicher (äußerer) numerischer Apertur herrscht, bevor die Bildgüte eine spürbare, im allgemeinen unzulässige Verschlechterung erfährt. Interpretiert man in dieser Weise Gl. (2.56a), so ist $I = 0{,}8$ gerade noch zulässig, was zu $\varrho^2 = 0{,}2$ und $\varrho = 0{,}447 \approx 0{,}45$ als obere Grenze für die zulässige Zentralabschattung führt.



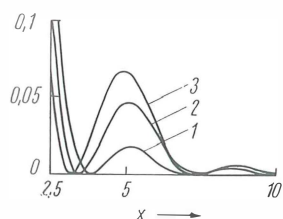


Bild 2.18. Intensitätsverlauf in der Beugungsfigur für aberrationsfrei abbildende Objektive ohne Zentralabschattung 1 und mit Zentralabschattung $\varrho = 32\%$ 2 und $\varrho = 45\%$ 3

Die Abszisse x ist ein dimensionsloses Maß für den Abstand vom Mittelpunkt der Beugungsfigur

Ein Objektiv mit dieser Zentralabschattung verträgt keine zusätzlichen Bildfehler und liegt nach dem Kriterium der Definitionshelligkeit an der Grenze des Zulässigen. Das Bestreben bei modernen Konstruktionen von Spiegelobjektiven ging deshalb dahin, die Zentralabschattung so weit zu verkleinern, daß sie völlig unschädlich ist. Das ist mit der Entwicklung von Spiegellinsenobjektiven gelungen (s. Abschn. 2.5.3.).

Aus der grafischen Darstellung im Bild 2.18 entnimmt man ferner, daß mit zunehmender Zentralabschattung der Durchmesser des zentralen Beugungsscheibchens kleiner wird. Daraus resultiert ein erhöhtes Auflösungsvermögen bei Objektiven mit Zentralblende. Für den Radius des auf die Objektebene bezogenen Beugungsscheibchens erhält man nach Gl. (2.54b)

$$y = c\,\frac{\lambda}{A}, \tag{2.57}$$

wobei der Koeffizient c in Tafel 2.3 für verschiedene Werte der Zentralabschattung angegeben ist. Nach der Definition des mikroskopischen Auflösungsvermögens gibt Gl. (2.57) auch den gerade noch aufgelösten Abstand zweier Punkte an.

Tafel 2.3. Koeffizient c in Gl. (2.57) in Abhängigkeit von der Zentralabschattung

Zentral-abschattung ϱ	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
c	0,61	0,60	0,58	0,56	0,53	0,50	0,47

Danach kann z. B. bei einer Zentralabschattung von $\varrho = 0{,}5$ bzw. 50% ein um etwa 20% kleinerer Abstand zweier Punkte als bei nicht zentralabgeschatteten Objektiven noch aufgelöst werden.

In der Praxis kann sich das erhöhte Auflösungsvermögen bei Objektiven mit Zentralblende nur bei genügend kontrastreichen Objekten auswirken, weil der Lichtstrom, der außerhalb des zentralen Beugungsscheibchens auf die Auffangebene

auftrifft, mit größer werdender Zentralabschattung zunimmt und in gewissem Sinne als Streulichtuntergrund anzusehen ist.
Der Streulichtuntergrund – bestimmt durch den Lichtstrom, der nicht in das zentrale Beugungsscheibchen fällt – ist bereits bei einem zentralabschattungsfreien und fehlerfrei abbildenden

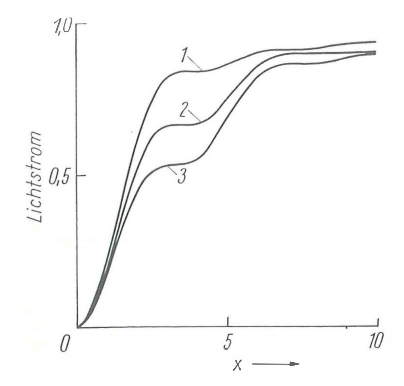


Bild 2.19. Verlauf des Lichtstroms in Abhängigkeit vom dimensionslosen Radius x der Beugungsfigur für ein aberrationsfrei abbildendes Objektiv ohne Zentralabschattung 1 und mit Zentralabschattung $\varrho = 32\%$ 2 und $\varrho = 45\%$ 3

Ähnliche Verhältnisse ergeben sich bei aberrationsbehafteten Objektiven

Objektiv vorhanden. Das zentrale Beugungsscheibchen enthält als Bildkern 83,8% des Gesamtlichtstroms, während sich 16,2% des Gesamtlichtstroms auf die Beugungsringe verteilen. Im Bild 2.19 ist der Verlauf des Lichtstroms in Abhängigkeit vom Radius x der Beugungsfigur, dessen genaue Bedeutung in Gl. (2.53) angegeben ist, für verschiedene Zentralabschattungen grafisch dargestellt.
Diesen Kurven liegt eine Integration zugrunde [37], die so normiert ist, daß der Gesamtlichtstrom, der zur unendlich ausgedehnten Beugungsfigur gehört, unabhängig von der Zentralabschattung 100% beträgt. Aus der Darstellung läßt sich unmittelbar entnehmen, welcher Teil der Gesamtenergie innerhalb eines Kreises vom Radius x mit dem Zentrum der Beugungsfigur als Mittelpunkt auf die Auffangebene auftrifft oder welcher Teil der Gesamtenergie außerhalb dieses Kreises noch vorhanden ist. Die erste Stufe jeder Kurve gibt den Teil der Energie an, der im zentralen Beugungsscheibchen konzentriert ist. Der restliche Teil der Energie, der stufenweise dem Zuwachs an Energie durch jeweils einen Beugungsring entspricht, kann als Streulichtuntergrund angesehen werden. An den Stellen, an denen die Stufen genau waagerecht verlaufen, liegen die Nullstellen der zugehörigen Kurven für die Intensität. Bei der Bewertung des Streulichtuntergrunds ist zu beachten, daß sich der Lichtstrom außerhalb des Bildkerns über eine verhältnismäßig große Fläche verteilt, so daß die Intensität oder Strahlungsdichte dort relativ gering ist.
Ähnliche Verhältnisse ergeben sich, wenn das Objektiv keine Zentralabschattung hat, dafür aber mit Bildfehlern behaftet ist, wie es für jedes Realobjektiv zutrifft.

2.4.2. Defokussierung und Schärfentiefe

Die Scharfeinstellung eines mikroskopischen Präparats ist – abgesehen von Sonderfällen, z. B. bei Phasenobjekten im Hellfeld – eine Voraussetzung für die mikroskopische Beobachtung. Diese Aussage erhält problemhaften Charakter, wenn man den Begriff der mikroskopischen Scharfeinstellung näher betrachtet. Den geometrisch-optischen Bildpunkt gibt es in Wirklichkeit nicht, weil von einem (leuchtenden) Objektpunkt durch die Abbildung ein Beugungsbild von räumlicher Ausdehnung entsteht. Damit ist ein gewisser Spielraum in der Scharfeinstellung verknüpft, den man als Einstellungenauigkeit oder auch als Schärfentiefe auffassen kann. Andererseits steht damit die Frage des axialen Auflösungsvermögens in unmittelbarem Zusammenhang. Eine Änderung der axialen Einstellung ist gleichbedeutend mit einer Defokussierung.

2.4.2.1. Einfluß der Defokussierung auf die Beugungsfigur

Die im Abschn. 2.4.1.1. beschriebene Gestalt der Beugungsfigur bezieht sich auf eine bildseitige Einstellebene, die durch den geometrisch-optischen Bildpunkt oder – was dasselbe bedeutet – durch den Mittelpunkt der bildseitigen sphärischen Wellenfläche des aberrationsfreien Systems hindurchgeht (Bild 2.15). Diese Ebene nennt man günstigste Einstellebene, weil sie zu einem Maximum an Bildhelligkeit im Zentrum der Beugungsfigur führt. Sie ist identisch mit der Einstellebene für die optimale Schärfe.
Liegt die Einstellebene vor oder hinter der günstigsten Einstellebene (intra- bzw. extrafokale Einstellung), so ändert sich die Lichtverteilung in der Beugungsfigur so, wie es im Bild 2.20 dargestellt ist. Mit zunehmender Defokussierung ver-

ringert sich die Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens. Der erste dunkle Ring, der bei der idealen Airyschen Lichtverteilung das zentrale Beugungsscheibchen begrenzt, wird mit Licht aufgefüllt, so daß der Bildkern verbreitert und zunehmend unscharf erscheint.

Die Intensitätsverteilung längs der optischen Achse erhält man durch die einfache Gleichung

$$I(\zeta) = \left(\frac{\sin\zeta}{\zeta}\right)^2. \qquad (2.58)$$

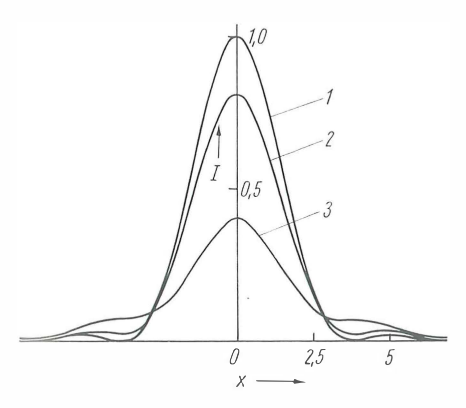
Die dimensionslose axiale Koordinate ζ steht mit der bildseitigen Koordinate b', die längs der optischen Achse zu messen ist und deren Ursprung im Bildpunkt O' bzw. in der günstigsten Einstellebene liegt, in dem Zusammenhang

$$\zeta = \frac{\pi n'}{2\lambda} \sin^2\sigma' b'$$

oder

$$b' = \frac{2\zeta}{\pi} \frac{\lambda}{n'\sin^2\sigma'} = \frac{2\zeta}{\pi} \frac{n'\lambda}{A'^2}. \qquad (2.59)$$

$A' = n' \sin\sigma'$ ist die bildseitige numerische Apertur. Die Funktion Gl. (2.58) ist so normiert, daß



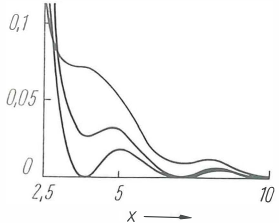


Bild 2.20. Intensitätsverlauf in der Beugungsfigur eines aberrationsfrei abbildenden Objektivs bei Defokussierung

1 ideale Airysche Intensitätsverteilung. Gegenüber der günstigsten Einstellebene um $\frac{1}{2}\,t_w$ defokussiert *2*, und t_w defokussiert *3*; $t_w = n\lambda/A^2$

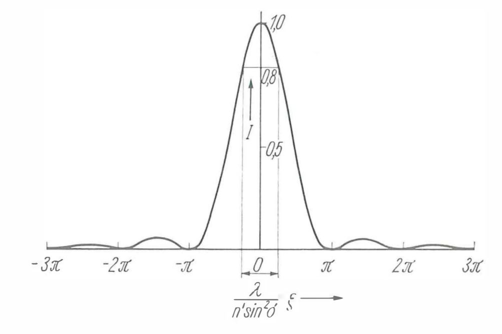


Bild 2.21. Intensität im Zentrum der Beugungsfigur längs der optischen Achse

Bei $\zeta = 0$ liegt die günstigste Einstellebene (Ebene optimaler Schärfe). Die Strecke $\lambda/n' \sin^2\sigma'$ ist die Einstelltoleranz bzw. die wellenoptische Schärfentiefe. Im Objektraum entspricht ihr die Strecke $t_w = n\lambda/A^2$

für $\zeta = 0$ bzw. $b' = 0$ $I = 1$ ist. Ihr Verlauf ist im Bild 2.21 dargestellt. Die erste Nullstelle liegt bei $\zeta = \pm\pi$ oder nach Gl. (2.59) bei $b' = \pm 2n'\lambda/A'^2$. Die Lichtverteilung in diesen Einstellebenen ist nicht im Bild 2.20 dargestellt. Ihnen entsprechen Beugungsfiguren, die im Zentrum eine dunkle Stelle enthalten und bei denen der Lichtstrom über eine größere Fläche verteilt ist. In diesen Einstellebenen ist die Abbildung bereits völlig unscharf.

Nach dem Kriterium der Definitionshelligkeit darf die Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens 80% der Intensität nicht unterschreiten, die im Zentrum des Airyschen Beugungsscheibchens auftritt, wenn gerade noch keine Bildverschlechterung merkbar sein soll. Durch Rechnung und aus der grafischen Darstellung im Bild 2.21 erhält man $I \approx 0{,}8$ an der Stelle $\zeta = \pm(\pi/4)$ oder nach Gl. (2.59) für

$$b' = \pm\frac{1}{2}\frac{\lambda}{n'\sin^2\sigma'} = \pm\frac{1}{2}\frac{n'\lambda}{A'^2}. \qquad (2.60\text{a})$$

Das Plus-Minus-Zeichen bedeutet, daß die Verschiebung der Einstellebene – bezogen auf die günstigste Einstellebene – nach beiden Seiten um den angegebenen Betrag erlaubt ist. Der doppelte Betrag

$$t' = 2b' = \frac{\lambda}{n'\sin^2\sigma'} = \frac{n'\lambda}{A'^2} \qquad (2.60\text{b})$$

gibt die Einstellungenauigkeit (Einstelltoleranz) an, d.h., den Spielraum, in dem die Einstellebenen liegen können, ohne daß das Bild unscharf wird. Diese Strecke kann auch als bildseitige (wellenoptische) Schärfentiefe bezeichnet werden.

Im Objektraum entspricht der Strecke $2b'$ die um den Tiefenmaßstab α nach Gl. (2.15) verkleinerte Strecke

$$2b = \frac{2b'}{\alpha}.$$

Man erhält für die Einstellungenauigkeit bzw. die Schärfentiefe im Objektraum, die man auch als wellenoptische Abbildungstiefe t_w bezeichnet,

$$t_w = 2b = \frac{n\lambda}{A^2}. \quad (2.61)$$

In der englischen Literatur ist hierfür die Bezeichnung Fokustiefe (depth of focus) gebräuchlich, die auch hin und wieder im Deutschen verwendet wird.

Aus Gl. (2.58) für die Intensitätsverteilung längs der optischen Achse und ihrer grafischen Darstellung im Bild 2.21 folgt, daß sie symmetrisch bezüglich der günstigsten Einstellebene ist. Das gilt nicht nur für die Intensitätsverteilung auf der Achse. Die Beugungsfiguren haben in Einstellebenen, die gleich weit vor oder hinter der günstigsten Einstellebene liegen, das gleiche Aussehen, vorausgesetzt, daß die Abbildung – abgesehen von der Defokussierung – fehlerfrei erfolgt. Bei vorhandenem Öffnungsfehler ist diese Symmetrie gestört. Einen Öffnungsfehler kann man aufgrund des unterschiedlichen Aussehens der Beugungsfiguren bei intra- und extrafokaler Einstellung erkennen.

Die Einstelltoleranz bzw. die wellenoptische Schärfentiefe kann auch durch das Rayleighsche $\lambda/4$-Kriterium abgeleitet werden. Es besagt, daß bei der Abbildung eines Objektpunkts durch ein optisches System die Bildgüte erst dann merkbar beeinträchtigt wird, wenn sich die optischen Weglängen von einer bildseitigen Wellenfläche des abbildenden Strahlenbündels bis zu dem betrachteten Bildpunkt um mehr als $\lambda/4$ unterscheiden. Um eine spürbare Verschlechterung der Bildqualität zu vermeiden, sollen deshalb die Unterschiede der optischen Weglängen für einen Bildpunkt kleiner als $\lambda/4$ sein.

2.4.2.2. Schärfentiefe bei der mikroskopischen Abbildung

Wellenoptische Schärfentiefe

Die im Abschn. 2.4.2.1. hergeleitete wellenoptische Schärfentiefe ist nach Gl. (2.61) zu berechnen. Sie ist von der Wellenlänge und der numerischen Apertur sowie von der Brechzahl im Objektraum abhängig. Dagegen ist sie von der Vergrößerung oder dem Abbildungsmaßstab des Mikroskops unabhängig. Entsprechend Bild 2.14 ist bei Durchlichtpräparaten für n die Brechzahl des Einbettungsmittels oder des Objekts selbst zu benutzen. Bei Auflichtpräparaten ist $n = 1$, wenn mit Trockenobjektiven gearbeitet wird, während bei der Verwendung von Immersionsobjektiven für n die Brechzahl der Immersionsflüssigkeit einzusetzen ist. Bleibt man im Bereich der förderlichen Vergrößerung, und ist die Akkommodation des Auges ausgeschaltet, so kann die Schärfentiefe bei der mikroskopischen Abbildungdurch t_w mit genügender Genauigkeit angegeben werden.

Die wellenoptische Schärfentiefe t_w ergibt sich nach Gl. (2.61) als doppelter Betrag des zulässigen Defokussierungsfehlers b, der als eine axiale Verschiebung von der optimalen Schärfenebene aus nach beiden Seiten hin erlaubt ist. Bei der Ableitung des Defokussierungsfehlers aus der Definitionshelligkeit erkennt man, daß dessen zulässiger Betrag noch von Restfehlern des optischen Abbildungssystems, z.B. vom Öffnungsfehler des Objektivs, oder von einer vorhandenen Zentralabschattung abhängt. Der zulässige Defokussierungsfehler wird dadurch kleiner. Das ist verständlich, wenn man bedenkt, daß die Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens durch den Einfluß einer Zentralabschattung oder eines Öffnungsfehlers herabgesetzt wird, so daß die weitere Verringerung dieser Intensität durch Defokussierung bereits bei einer kleineren Defokussierung die vorgegebene Grenze von $I = 0{,}8$ gegenüber $I = 1{,}0$ bei einem idealen Beugungsscheibchen erreicht.

Diese Ausführungen sollen darauf hinweisen, daß die wellenoptische Schärfentiefe im Prinzip von weiteren Einflüssen abhängig sein kann. Auf diese Feinheiten wird hier nicht näher eingegangen. Das erscheint um so mehr berechtigt, als für die Bestimmung der Schärfentiefe bei der mikroskopischen Abbildung im allgemeinen weitere Terme zu beachten sind, die der geometrisch-optischen Unschärfe und gegebenenfalls der Akkommodation des Auges Rechnung tragen.

Geometrisch-optische Schärfentiefe

Wir nehmen an, daß ein optisches System eine aberrationsfreie Abbildung liefert. Einem Objektpunkt O ist dann geometrisch-optisch ein Bildpunkt O' zugeordnet. Bei optimaler Einstellung des optischen Systems (Bild 2.22a) liegt O' in der bildseitigen Einstellebene (E–E). Bei der mikroskopischen Abbildung sei diese Einstellebene entweder die Auffangebene (Mattscheibe, Filmebene)

oder die Zwischenbildebene des Mikroskopobjektivs, die z. B. durch eine Strichplatte des Okulars markiert sein kann. Verschiebt man bei unveränderter Einstellung des optischen Systems die Auffangebene in oder entgegen der Lichtrichtung um die Strecke b', so erhält man anstelle der punktförmigen Strahlenvereinigung einen Unschärfekreis vom Durchmesser u'. Es entsteht die aus Bild 2.22 zu entnehmende Gleichung

$$b' = \pm\frac{1}{2}\,\frac{u'}{\tan\sigma'} \approx \pm\frac{1}{2}\,\frac{u'}{\sin\sigma'}, \tag{2.62a}$$

wobei aufgrund des kleinen Werts σ' im Bildraum des Mikroskopobjektivs $\tan\sigma'$ durch $\sin\sigma'$ ersetzt werden kann. Die geometrisch-optische Schärfentiefe im Bildraum ist durch die Strecke

$$2b' = \frac{u'}{\sin\sigma'} \tag{2.62b}$$

gegeben, wenn u' den Durchmesser des zulässigen Unschärfekreises angibt.

In der mikroskopischen Praxis ist die Schärfentiefe bzw. die Einstellungenauigkeit im Objektraum von Interesse. Die Einstellebene im Bildraum ist durch eine Strichplatte in der Zwischenbildebene des Objektivs oder durch die Auffangebene fest vorgegeben (E–E im Bild 2.22b und c). Interessant ist die Strecke b im Objektraum, um die eine Objekteinzelheit von der optimalen Schärfenebene (gestrichelte Linie im Bild 2.22) entfernt sein kann, ohne daß der in der Einstellebene entstehende Unschärfekreis vom Durchmesser u' störend wirkt.

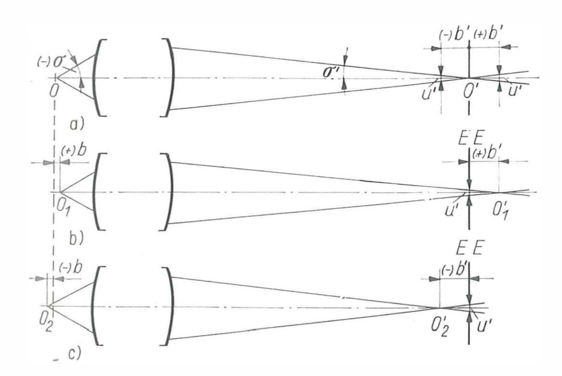


Bild 2.22. Zur geometrisch-optischen Schärfentiefe eines optischen Systems

Dabei ist es gleichgültig, ob die mit O, O_1 und O_2 bezeichneten Objektpunkte verschiedene Objekteinzelheiten eines räumlich ausgedehnten Objekts darstellen oder ob diese Objektpunkte dieselbe Objekteinzelheit darstellen, die durch veränderte Einstellung des Mikroskops – durch das Spiel beim Fokussieren – nacheinander in die gezeichnete Lage kommen.

Zwischen den bildseitigen Größen b' und u' gilt Gl. (2.62a), wobei σ' der bildseitige halbe Öffnungswinkel ist und mit dem entsprechenden Winkel im Bild 2.22a annähernd gleichgesetzt werden kann. Im Objektraum entspricht der Strecke b' die um den Tiefenmaßstab α nach Gl. (2.15) verkleinerte Strecke

$$b = \frac{b'}{\alpha} = \pm\frac{1}{2}\,\frac{u'}{\sin\sigma'}\,\frac{n}{n'}\,\frac{1}{M^2}.$$

Die Abbesche Sinusbedingung Gl. (2.77) kann man in der Gestalt

$$\sin\sigma' = \frac{n\sin\sigma}{n'M} = \frac{A}{n'M}$$

schreiben. Damit erhält man

$$b = \pm\,\frac{1}{2}\,\frac{nu'}{AM}$$

und als geometrisch-optische Schärfentiefe den doppelten Betrag von b

$$t_g = 2b = \frac{nu'}{AM}. \tag{2.63a}$$

Sie ist abhängig von der numerischen Apertur und dem Abbildungsmaßstab des Mikroskops, der Brechzahl im Objektraum sowie von der Größe des Unschärfekreises. Die Größe des zulässigen Unschärfekreises kann aufgrund der unterschiedlichen physiologischen Bedingungen beim Sehen nicht ohne Willkür erfolgen. Man rechnet nach *Michel* [30] mit 2′ als zulässigem Sehwinkel für den Unschärfekreis. Zwischen dem Durchmesser des Unschärfekreises u' und dem Sehwinkel σ_P, unter dem er in der konventionellen Sehweite erscheint, besteht die Beziehung $u' = 250\,\widehat{\sigma_P}$, wobei $\widehat{\sigma_P}$ im Bogenmaß einzusetzen ist und u' in mm erhalten wird. Zugeordnete Wertepaare können Tafel 2.1 (S. 31) entnommen werden. Dem Sehwinkel 2′ entspricht in der konventionellen Sehweite von 250 mm ein Unschärfekreis von Dmr. 0,15 mm. Mit $u' = +\,0{,}15$ mm ergibt sich t_g nach der Gleichung

$$t_g = 0{,}15\,\frac{n}{AM} \quad \text{in mm}, \tag{2.63b}$$

wobei M der Abbildungsmaßstab des Endbilds ist, und bei visueller Benutzung des Mikroskops

$$t_g = 0{,}15 \frac{n}{A V_{\mathrm{Mikr}}}. \qquad (2.63\,\mathrm{c})$$

Die geometrisch-optische Schärfentiefe wird zur Bestimmung der Schärfentiefe bei der mikroskopischen Abbildung nur in einer mit der wellenoptischen Schärfentiefe kombinierten Form verwendet (s. Gl. (2.65)), die außerdem den Einfluß der Akkommodation des Auges berücksichtigt. In dem Spezialfall der einstufigen Mikroskopie bei lupenfotografischen Aufnahmen wird die Schärfentiefe auf der Basis der geometrisch-optischen Schärfentiefe berechnet (s. Gl. (2.67)).

Einfluß der Akkommodation auf die Schärfentiefe

Bei einer festen Mikroskopeinstellung kann ein gewisser Tiefenbereich eines räumlich ausgedehnten Objekts dadurch scharf gesehen werden, daß sich die Einstellung des Auges von einer Fern- auf eine Naheinstellung ändert oder zwischen beiden Einstellungen pendelt. Der Tiefenbereich wird durch die sich ändernde Akkommodation zeitlich nacheinander abgetastet.

Der Schärfentiefebereich, der durch unterschiedliche Akkommodation bedingt ist, läßt sich leicht bestimmen. Ist bei der mikroskopischen Beobachtung das Auge auf unendliche Bildweite akkommodiert, so liegt die zugeordnete Objektebene in der vorderen Brennebene des Mikroskops (s. Bild 2.11 a). Bei einer anderen Einstellung des Auges (z. B. bei der Sehweite w') liegt die zugeordnete Objektebene von der vorderen Brennebene des Mikroskops um die Strecke z entfernt. Pendelt das Auge durch Akkommodation zwischen den Sehweiten w'_1 und w'_2, so ergibt sich als zugeordnete Schärfentiefe im Objektraum die Strecke

$$t_a = z_1 - z_2 = n \frac{62\,500}{V^2_{\mathrm{Mikr}}} \left(\frac{1}{w'_1} - \frac{1}{w'_2} \right), \qquad (2.64)$$

die auch als Akkommodationstiefe bezeichnet wird; n ist die Brechzahl im Objektraum. In dem Sonderfall, daß die eine Grenze des Akkommodationsbereichs der Fernpunkt eines rechtsichtigen Auges ist, erhält man durch $w'_2 = \infty$

$$t_a = n \frac{62\,500}{V^2_{\mathrm{Mikr}}} \frac{1}{w'_1}, \qquad (2.64\,\mathrm{a})$$

wobei w'_1 die Sehweite für die Naheinstellung des Auges ist. Um die Akkommodationstiefe in mm zu erhalten, sind die Sehweiten an den Grenzen des Akkommodationsbereichs w'_1 und w'_2 in mm einzusetzen.

Geläufiger ist die Angabe des Akkommodationsbereichs in Dioptrien. Im Bild 2.23 ist der Zu-

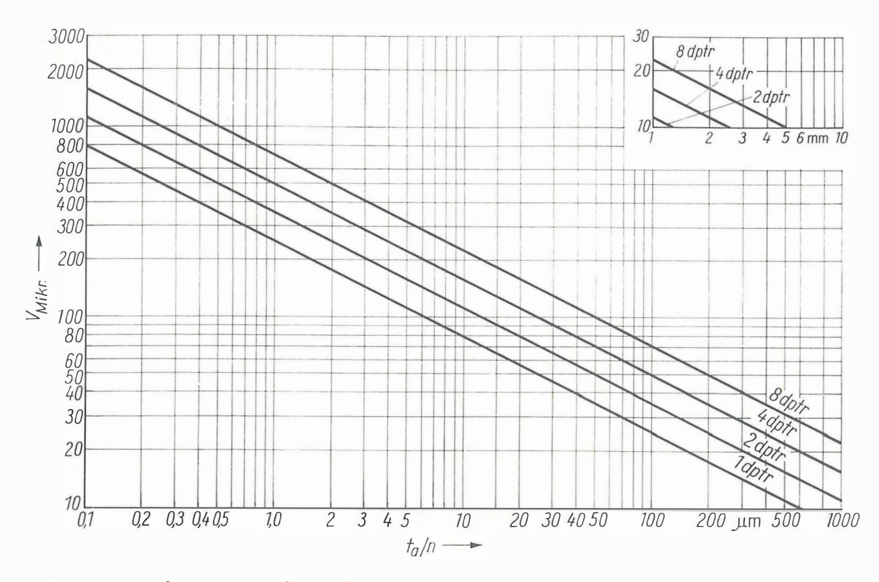


Bild 2.23. Grafische Darstellung der Akkommodationstiefe t_a nach Gl. (2.64) in Abhängigkeit von der Mikroskopvergrößerung (Ordinate)

Die Geraden sind für die Akkommodationsbreite 1, 2, 4 und 8 Dioptrien gezeichnet, sie gelten ferner für $n = 1$. Ist die Brechzahl n im Objektraum $\neq 1$, so ist die aus der grafischen Darstellung entnommene Akkommodationstiefe noch mit n zu multiplizieren

sammenhang zwischen Akkommodationstiefe t_a, Mikroskopvergrößerung V_{Mikr} und dem in dpt angegebenen Akkommodationsbereich grafisch dargestellt. Der Akkommodationsbereich beträgt mit den Sehweiten $w'_1 = 250$ mm (konventionelle Sehweite) und $w'_2 = \infty$ (Fernpunkt eines rechtsichtigen Auges) 4 dpt, denn $1/w'_1 - 1/w'_2 = 1/0{,}25\ \text{m} - 0 = 4$ dpt. Die Akkommodationsbreite als Akkommodationsbereich zwischen Fernpunkt und kürzestmöglicher Naheinstellung ist altersbedingt und verringert sich beim gesunden menschlichen Auge nach den Angaben in Tafel 2.4.

Tafel 2.4. Akkommodationsbreite in Abhängigkeit vom Lebensalter

Alter in Jahren	10	20	30	40	50	60
Akkommodationsbreite in dpt (Durchschnitt)	12	10	8	6	2	1,4

Bei Tiefenmessungen durch Scharfeinstellungen mit dem Mikroskop muß darauf geachtet werden, daß die wellenoptisch bzw. geometrisch-optisch bedingte Schärfentiefe nicht durch den Einfluß der Akkommodation des Auges, d.h. durch die Akkommodationstiefe, vergrößert wird, was eine größere Einstellungenauigkeit und damit eine größere Meßungenauigkeit zur Folge hätte. Die Wirkung unterschiedlicher Akkommodation muß bei solchen Beobachtungen dadurch ausgeschaltet werden, daß in der Brennebene des Okulars eine Strichmarkierung angeordnet wird, die gleichzeitig mit dem Objektdetail scharf gesehen werden muß. Die Einstellung auf die Strichmarkierung zwingt das Auge zu einem bestimmten Akkommodationszustand, der während der Messungen erhalten bleibt.

Ist eine Festlegung auf einen bestimmten Akkommodationszustand nicht gegeben, so nimmt die Akkommodationstiefe mit kleiner werdender Mikroskopvergrößerung rasch zu. Bei einem Akkommodationsbereich von 4 dpt beträgt die durch Akkommodation bedingte Schärfentiefe bei 1000facher Mikroskopvergrößerung nur 0,25 µm, während sie bei 100facher Mikroskopvergrößerung 25 µm und bei 10facher Mikroskopvergrößerung einen Wert von 2,5 mm erreicht (s. Bild 2.23).

Kombinierte Gleichung für die Schärfentiefe

Bei der Erläuterung der Gl. (2.61) für die wellenoptische Schärfentiefe t_w wurde festgestellt, daß die Schärfentiefe bei der mikroskopischen Abbildung durch t_w mit genügender Genauigkeit angegeben wird, wenn man im Bereich der förderlichen Vergrößerung bleibt und die Akkommodation des Auges ausgeschaltet ist. Ohne diese Einschränkungen ist für die Bestimmung der Schärfentiefe t_{ges} bei der mikroskopischen Abbildung die Gleichung

$$t_{ges} = \tfrac{1}{2}t_w + t_g + t_a \tag{2.65a}$$

anzuwenden, die allgemein gültig ist. Sie lautet ausführlich

$$t_{ges} = \frac{n\lambda}{2A^2} + 0{,}15\,\frac{n}{A\,V_{Mikr}} + 62\,500\,\frac{n}{V_{Mikr}^2}\left(\frac{1}{w'_1} - \frac{1}{w'_2}\right), \tag{2.65b}$$

wobei die Terme für t_w, t_g, t_a nach den Gln. (2.61), (2.63c), (2.64) eingesetzt sind. Der letzte Term für die Akkommodationstiefe spielt nur bei subjektiver mikroskopischer Beobachtung eine Rolle und kann überdies durch besondere Maßnahmen unwirksam gemacht werden. Die ersten beiden Terme geben die Schärfentiefe bei der mikroskopischen Abbildung an, wenn die Akkommodation des Auges ausgeschaltet ist (z.B. bei der mikrofotografischen Abbildung). Sie wird unter der Abkürzung t_m zusammengefaßt:

$$t_m = n\left(\frac{\lambda}{2A^2} + \frac{0{,}15}{A\,V_{Mikr}}\right). \tag{2.66}$$

Anstelle der Mikroskopvergrößerung V_{Mikr} kann der Abbildungsmaßstab M des Endbilds eingesetzt werden. Da in Gl. (2.66) als Zahlenfaktor $u' = 0{,}15$ mm eingeht, müssen λ und t_m bei der Berechnung ebenfalls in Millimeter ausgedrückt werden.

Für $\lambda = 0{,}55$ µm und eine Anzahl von häufig vorkommenden numerischen Aperturen ist die Schärfentiefe t_m – oder genauer die Größe t_m/n – im Bild 2.24 in Abhängigkeit von der Mikroskopvergrößerung bzw. vom Abbildungsmaßstab grafisch dargestellt.

Die gestrichelten Teile der Kurven enden bei $V_{Mikr} = 100\,A$ bzw. $V_{Mikr} = 2000\,A$. Grafische Darstellungen in der Literatur, die den Zusammenhang zwischen Schärfentiefe, numerischer Apertur und Vergrößerung so zeigen, daß die Schärfentiefe bei jeder beliebigen Apertur bis hin zu den kleinsten Vergrößerungen angegeben wird, sind irreführend. In der Praxis wird man sich bei einer gegebenen numerischen Apertur des Objektivs nicht beliebig weit von dem Bereich der för-

derlichen Vergrößerung entfernen. In den Kurven im Bild 2.24 kommt deutlich zum Ausdruck, daß zu einer gegebenen numerischen Apertur, mit der die Kurven bezeichnet sind, ein begrenzter Schärfentiefebereich gehört. Bleibt man im Bereich der förderlichen Vergrößerung, so schwankt die Schärfentiefe t_m nur innerhalb enger Grenzen.
Die kombinierte Gleichung läßt sich folgendermaßen erklären, wobei wir uns auf Gl. (2.66) beschränken können, da die Akkommodationstiefe im vorhergehenden Abschnitt erklärt ist. Ungefähr an der unteren Grenze der förderlichen Vergrößerung, bei der alle aufgelösten Objektstrukturen gerade deutlich und bequem erkennbar sind, werden beide Terme gleich groß, d.h., $t_g = \frac{1}{2}t_w$, und somit wird die Schärfentiefe t_m gleich der wellenoptischen Schärfentiefe t_w. Nimmt die Vergrößerung ab, so wächst der zweite Term im Vergleich zu dem konstant bleibenden ersten Term an und bestimmt somit die Schärfentiefe. Bei Vergrößerungen weit unterhalb der förderlichen Vergrößerung wird das einem Objektpunkt zugeordnete Beugungsscheibchen so klein abgebildet, daß die Überlegungen in den Abschnitten 2.4.2.1. und 2.4.2.2. über die zulässige Intensitätsverringerung im Zentrum des Beugungsscheibchens nicht mehr zutreffen, weil eine solche nicht mehr wahrgenommen wird. Der Kern der räumlichen Beugungsfigur, d.h. der geometrisch-optische Bildpunkt, kann unter diesen Umständen weiter von der Auffangebene entfernt sein, ehe der entstehende Unschärfekreis als störend wahrgenommen wird. Die Schärfentiefe wird somit größer als die wellenoptisch bestimmte und vornehmlich durch den geometrisch-optischen Term beherrscht.
Berek bezeichnet den zweiten Term als den, der der Perzeptionsbreite des Auges Rechnung trägt. Anstelle $u' = 0{,}15$ mm wird in der von *Berek* [13] angegebenen kombinierten Gleichung $u' = 0{,}35$ mm verwendet, so daß man größere Schärfentiefen erhält.

Schärfentiefe bei lupenfotografischer Abbildung

Bei der Berechnung der Schärfentiefe für die lupenfotografische Abbildung ist es üblich, von der geometrisch-optischen Schärfentiefe auszugehen. Das ist nach den Erläuterungen zur kombinierten Gl. (2.66) dann berechtigt, wenn man unterhalb der unteren Grenze der förderlichen Vergröße-

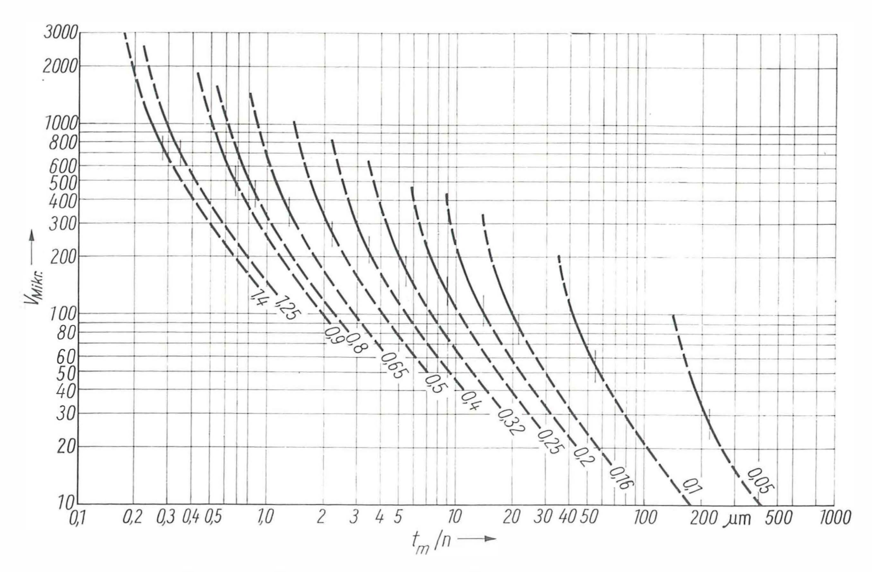


Bild 2.24. Grafische Darstellung der Schärfentiefe bei der mikroskopischen Abbildung in Abhängigkeit von der Mikroskopvergrößerung bzw. vom Abbildungsmaßstab (Ordinate) und für häufig vorkommende numerische Aperturen (Kurvenparameter)

Als Abszisse ist t_m/n nach Gl. (2.66) für $\lambda = 550$ nm angegeben. Um die Schärfentiefe t_m zu erhalten, ist der abgelesene Abszissenwert noch mit der Brechzahl n im Objektraum zu multiplizieren. Bei Durchlichtpräparaten ist für n die Brechzahl des Objekts oder des Einbettungsmittels zu wählen (s. Bild 2.14). Bei unbedeckten Auflichtpräparaten gilt für Trockensysteme $n = 1$, bei Immersionssystemen ist n die Brechzahl der Immersionsflüssigkeit. – Der ausgezogene Teil der Kurven gibt den Bereich der förderlichen Vergrößerung an. Der senkrechte Strich in jeder Kurve gibt den Wert der wellenoptischen Schärfentiefe t_w an. – Soll die Wirkung der Akkommodation auf die Schärfentiefe berücksichtigt werden, ist die aus Bild 2.23 zu entnehmende Akkommodationstiefe zu addieren

Tafel 2.5. Schärfentiefe in mm bei lupenfotografischen Aufnahmen

Abb.-Maßstab M	Öffnungsverhältnis 1 : 1,6	1 : 2,5	1 : 3,5	1 : 4,5	1 : 6,3	1 : 8	1 : 11	1 : 16
1 : 1	0,96	1,5	2,1	2,7	3,8	4,8	6,6	9,6
2 : 1	0,36	0,56	0,79	1,0	1,4	1,8	2,5	3,6
3 : 1	0,21	0,33	0,47	0,60	0,84	1,1	1,5	2,1
4 : 1	0,15	0,23	0,33	0,42	0,59	0,75	1,0	1,5
5 : 1	0,12	0,18	0,25	0,32	0,45	0,58	0,79	1,2
7 : 1	0,078	0,12	0,17	0,22	0,31	0,39	0,54	0,78
10 : 1	0,053	0,083	0,12	0,15	0,21	0,26	0,36	0,53
15 : 1	0,034	0,053	0,075	0,096	0,13	0,17	0,24	0,34
20 : 1	0,025	0,039	0,055	0,071	0,10	0,13	0,27	0,25
30 : 1	0,017	0,026	0,036	0,047	0,065	0,083	0,11	0,17
40 : 1	0,012	0,019	0,027	0,035	0,048	0,061	0,085	0,12
50 : 1	0,010	0,015	0,021	0,028	0,039	0,049	0,067	0,098

rung bleibt. Andernfalls wäre es angebracht, die kombinierte Gleichung zu verwenden.

Die geometrisch-optische Schärfentiefe ist gegeben durch Gl. (2.63a)

$$t_g = \frac{nu'}{AM} \quad \text{mit} \quad u' = 0{,}15 \text{ mm}.$$

Lupenfotografische Objektive sind wie Fotoobjektive durch Brennweite und Öffnungsverhältnis gekennzeichnet. Die wirksame numerische Apertur richtet sich nach dem gewählten Durchmesser der Öffnungsblende und dem Abbildungsmaßstab der einstufigen Abbildung. Nach Gl. (2.48a) erhält man

$$t_g = \frac{2nu'}{\Omega} \frac{1}{M} \left(1 + \frac{1}{|M|}\right) \tag{2.67a}$$

oder mit $u' = 0{,}15$ mm und $n = 1$

$$t_g = 0{,}3 \frac{1}{\Omega} \frac{1}{M} \left(1 + \frac{1}{|M|}\right) \text{ in mm.} \tag{2.67b}$$

Das Öffnungsverhältnis $\Omega = 2h/f'$ ist dem Durchmesser der Öffnungsblende proportional.

In Tafel 2.5 ist nach Gl. (2.67b) die Schärfentiefe bei lupenfotografischen Aufnahmen für eine Reihe von Öffnungsverhältnissen und Abbildungsmaßstäben angegeben.

Bemerkung: In der Fotografie ist es üblich, den zulässigen Unschärfekreis nach dem Bildformat zu bestimmen. Es gilt, daß der Durchmesser des zulässigen Unschärfekreises u' etwa 1/1000 der Bilddiagonale betragen kann. Bei einem 9×12-Format beträgt die Bilddiagonale etwa 15 cm und somit $u' = 0{,}15$ mm. Dies stimmt mit der Festlegung für den Unschärfekreis überein.

Bei offener Blende der lupenfotografischen Objektive (z.B. Objektive M) ist das aufgravierte oder in der Gebrauchsanleitung angegebene Öffnungsverhältnis beim Gebrauch der Tafel zu wählen. Bei Abblendung ist zu beachten, daß sich das Öffnungsverhältnis proportional zum Durchmesser der Irisblende verkleinert.

2.4.3. Monochromatische Abbildungsfehler

Bei der in der Praxis üblichen Abbildung von Objektpunkten mit unterschiedlichem Öffnungswinkel und durch Strahlenbündel, deren Hauptstrahlen zur optischen Achse geneigt verlaufen, läßt sich eine punktförmige Strahlenvereinigung nicht erreichen. In einer Auffangebene, die rechtwinklig zur optischen Achse des abbildenden optischen Systems am Ort des entstehenden Bilds angeordnet ist, entstehen anstelle von Bildpunkten Zerstreuungsfiguren, die man als Punktdiagramm (engl. spot diagram) darstellen kann, wenn man die Durchstoßpunkte einer möglichst großen Anzahl von Strahlen eines Strahlenbündels durch die Auffangebene markiert. Da diese Erscheinungen als Abweichungen von der idealen punktförmigen Abbildung des Gaußschen Raums aufgefaßt werden können, bezeichnet man sie als Abbildungsfehler oder als Bildfehler.

Man unterscheidet monochromatische Abbildungsfehler, die bei brechenden Flächen bei einfarbigem Licht und bei spiegelnden Flächen unabhängig von der Wellenlänge auftreten, und Farbfehler bzw. chromatische Abbildungsfehler, die durch die Wellenlängenabhängigkeit der Brechzahl des Linsenmaterials bedingt sind. Betrachtet man den Abbildungsvorgang wellenop-

tisch, so kommen Abbildungsfehler dadurch zum Ausdruck, daß die von einem leuchtenden Punkt entstehende Beugungsfigur gegenüber der idealen Airyschen Beugungsfigur verändert erscheint. Dabei kann die Rotationssymmetrie der Beugungsfigur erhalten bleiben und sich nur die Lichtverteilung ändern. Das trifft bei der Abbildung mit einer ringförmigen Pupille (s. Abschn. 2.4.1.2.) und bei der Defokussierung (s. Abschn. 2.4.2.1.) sowie beim Öffnungsfehler zu. Die Beugungsfiguren von Objektpunkten, die größeren Abstand von der optischen Achse haben, sind nicht mehr rotationssymmetrisch, sondern zeigen nur noch Symmetrie zu einer Ebene (Asymmetriefehler, Koma) bzw. zu zwei aufeinander rechtwinklig stehenden Ebenen (Astigmatismus). Ihre Lichtverteilung ist kompliziert. Hinzu kommt, daß der optimale Bildort eines außeraxialen Objektpunkts meist vor oder hinter der Bildebene liegt, die durch den „Bildpunkt" des axialen Objektpunkts hindurchgeht. Dieser Abbildungsfehler tritt als Bildfeldwölbung in Erscheinung. Den nichtrotationssymmetrischen Beugungsfiguren von Objektpunkten, die einen größeren Abstand von der optischen Achse haben, können rotationssymmetrische Anteile des Defokussierungsfehlers und auch des Öffnungsfehlers überlagert sein.

Im folgenden wird vorausgesetzt, daß das optische System zentriert ist, d.h., daß die Krümmungsmittelpunkte der optischen Flächen sämtlich auf der optischen Achse liegen. Dann kann man fünf typische Abbildungsfehler unterscheiden:

Öffnungsfehler
Koma
Astigmatismus
Bildfeldwölbung
Verzeichnung.

Die Grundlage für diese Einteilung bildet die Bildfehlertheorie 3. Ordnung, die man nach dem Mathematiker *Seidel* auch als Seidelsche Bildfehlertheorie bezeichnet. Sie beruht darauf, daß in den Gleichungen die exakt gültigen trigonometrischen Funktionen, wie sin x, cos x usw., die bei der Brechung und der Spiegelung eine Rolle spielen, durch ihre Reihenentwicklungen bis zur 3. Ordnung angenähert dargestellt werden:

$$\sin x \approx x - \frac{x^3}{3!}, \quad \cos x \approx 1 - \frac{x^2}{2}.$$

Die Einteilung nach Abbildungsfehlern kann auch dann beibehalten werden, wenn bei der Abbildung durch ein optisches System Abbildungsfehler höherer Ordnung zu berücksichtigen sind.

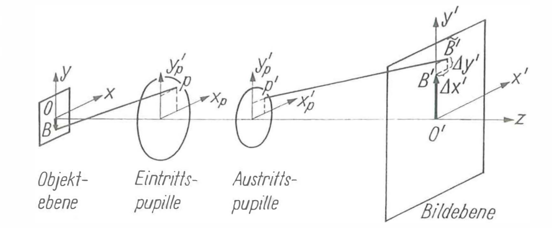


Bild 2.25. Zur Erläuterung der Queraberrationen

Geometrisch-optisch werden die Abbildungsfehler entweder als Queraberrationen oder als Längsaberrationen dargestellt. Im Bild 2.25 wird die Queraberration so dargestellt, daß in der Objektebene ein außeraxialer Objektpunkt B mit den Koordinaten $x = O$ und $y = OB$ gegeben ist, dem in der Bildebene der Gaußsche Bildpunkt B' mit den Koordinaten $x' = O$ und $y' = O'B' = yM$ entspricht, wobei M der Abbildungsmaßstab ist. Die Ebene, die durch das Objekt OB und die optische Achse bestimmt ist, im Bild 2.25 also die durch die y-Achse und die z-Achse bestimmte Ebene, heißt Meridionalebene. In ihr verlaufende Strahlen werden Meridionalstrahlen genannt. Strahlen, die nicht in der Meridionalebene verlaufen, heißen windschiefe Strahlen. Ein solcher von B ausgehender windschiefer Strahl wird im Bild 2.25 gezeigt. Er zielt nach einem Punkt P der Eintrittspupille mit den Koordinaten x_P, y_P. Nach Durchgang durch das nicht dargestellte optische System geht er im Bildraum durch den Punkt P' der Austrittspupille mit den Koordinaten x'_P, y'_P und durchstößt die Bildebene im Punkt $\tilde{B}'$, der von dem Gaußschen Bildpunkt B' um die Strecke $B'\tilde{B}'$ abweicht, die als Queraberration bezeichnet wird. Es ist üblich, die Queraberration in die meridionale Komponente $\Delta y'$ und eine dazu rechtwinklige Komponente $\Delta x'$ zu zerlegen. Sie ist die sagittale Komponente der Queraberration. Bei Meridionalstrahlen verschwindet die sagittale Komponente, und es bleibt nur eine meridionale Queraberration bestehen.

Längsaberrationen werden in Lichtrichtung bzw. in Richtung der optischen Achse gemessen. Eine

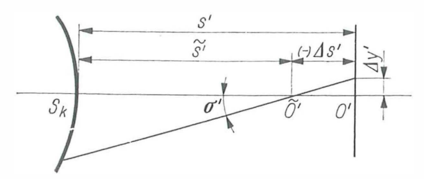


Bild 2.26. Längsaberration $\Delta s'$ und ihr Zusammenhang mit der Queraberration $\Delta y'$

Längsaberration ist z. B. der Abstand des Schnittpunkts eines Strahls mit der optischen Achse von der Bildebene. Bild 2.26 ist zu entnehmen, daß zwischen der Längsaberration $\Delta s'$ und der Queraberration $\Delta y'$ ein Zusammenhang besteht. Für diesen gilt die einfache Beziehung

$$\Delta y' = -\Delta s' \tan \sigma', \qquad (2.68)$$

die für die Umrechnung der Längsaberrationen des Öffnungsfehlers in Queraberrationen benutzt werden kann.
Im folgenden werden die einzelnen Abbildungsfehler näher erläutert, wobei besonders anhand des Öffnungsfehlers Korrektionsmöglichkeiten, verschiedene Darstellungen, zulässige Bildfehlertoleranzen und die experimentellen Verfahren zur Erkennung des Bildfehlers angegeben werden.

2.4.3.1. Öffnungsfehler, Definitionshelligkeit

Allgemeines

Die Strahlen eines achsenparallel in eine Sammellinse eintretenden Strahlenbündels haben nach Durchgang durch die Linse eine um so kürzere Schnittweite und damit eine um so größere Längsabweichung, je weiter sie von der Achse entfernt sind. Diese Erscheinung nennt man Öffnungsfehler oder auch sphärische Aberration. Die letztere Bezeichnung weist darauf hin, daß dieser Bildfehler durch die Wirkung der Kugelflächen entsteht. Da er jedoch nicht auf die Wirkung sphärischer Flächen beschränkt ist, sollte man den Begriff Öffnungsfehler benutzen, der das Typische des Bildfehlers wesentlich besser kennzeichnet. Die Einhüllende des Strahlenbündels, die der geometrische Ort der Schnittpunkte benachbarter Bildstrahlen ist, nennt man die kaustische Fläche (Brennfläche). Im Bild 2.27 ist für die obere Strahlenhälfte ihr Schnitt mit der Meridionalebene dargestellt (kaustische Linie). Im Bereich der Strahlenvereinigung gibt es eine Stelle engster Einschnürung, an der die kreisförmige Zerstreuungsfigur am kleinsten ist. Bei größerem Öffnungsfehler kann die Stelle engster Einschnürung als effektiver Bildort betrachtet werden. Dieser liegt näher am Bildpunkt des Randstrahls – des Öffnungsstrahls größter Einfallshöhe – als am Gaußschen Bildpunkt O'. Bei kleinerem Öffnungsfehler wird der effektive Bildort wellenoptisch nach dem Kriterium der Definitionshelligkeit bestimmt, wonach die günstigste Einstellebene dort ist, wo im Zentrum der Beugungsfigur die größte Helligkeit herrscht. Bei einem Öffnungsfehler nach Bild 2.27 (Öffnungsfehler 3. Ordnung oder primäre sphärische Aberration) liegt die günstigste Einstellebene um die Strecke $b' = 0{,}5 \Delta s'_{max}$ vom Gaußschen Bildpunkt entfernt, d.h. in der Mitte zwischen dem Bildpunkt des Randstrahls und dem Gaußschen Bildpunkt.
Falls die Schnittweite eines Öffnungsstrahls s' kleiner als die Schnittweite des paraxialen Strahls ist, d.h. im Fall $\tilde{s}' < s'$ oder $\Delta s' < 0$, ist der Strahl „unterkorrigiert". Im andern Fall, d.h. für $\tilde{s}' > s'$ oder $\Delta s' > 0$, ist der Strahl „überkorrigiert". Bei einer Sammellinse sind – abgesehen von wenigen Ausnahmen (z.B. aplanatische Linse) – sämtliche Strahlen unterkorrigiert, und zwar so, daß die Strahlen mit größerer Einfallshöhe bzw. größerem Öffnungswinkel stärker unterkorrigiert sind. Man sagt kurz: Der Öffnungsfehler einer Sammellinse ist unterkorrigiert oder auch die Sammellinse ist „sphärisch unterkorrigiert". Eine Zerstreuungslinse zeigt den entgegengesetzten Effekt; ihr Öffnungsfehler ist überkorrigiert. Es ist daher verständlich, daß durch Kombination einer Sammellinse und einer Zerstreuungslinse bei geeigneter Glaswahl der Öffnungsfehler korrigiert werden kann, allerdings meist nur für einen Strahl einer bestimmten Öffnung oder für eine bestimmte Zone, während z.B. für Strahlen geringerer Öffnung ein Restfehler von Unterkorrektion und für Strahlen größerer Öffnung ein Restfehler von Überkorrektion bestehen bleiben kann.

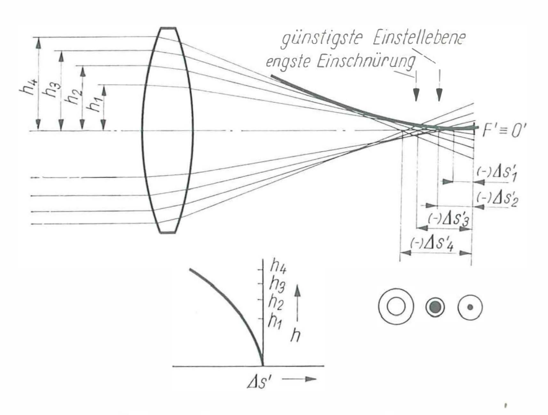


Bild 2.27. Öffnungsfehler einer Sammellinse (Unterkorrektion)

Die Höhenabstufung der parallel einfallenden Strahlen ist so gewählt, daß die Flächeninhalte und damit die Strahlungsenergie im inneren Kreis und in den Kreisringen (linkes Bild) untereinander gleich sind. Den Einfallshöhen h_i entsprechen die Längsaberrationen $\Delta s'_i$

Öffnungsfehler einer Linse und eines Spiegels

Der Öffnungsfehler einer Linse ist von der Linsenform oder von der Durchbiegung der Linse abhängig.

Für eine Sammellinse soll für den Sonderfall eines parallel einfallenden Lichtbündels, d.h. für $s = \infty$ (Bild 2.27), der Öffnungsfehler in Abhängigkeit von der Linsenform bestimmt werden. Ebenfalls soll untersucht werden, wann der Öffnungsfehler ein Minimum wird. Diese Fragen gehören zur Optikkonstruktion und Optikberechnung und dienen der Korrektion. Aus der Bildfehlertheorie 3. Ordnung erhält man für die Längsaberration

$$\Delta s' = -\tfrac{1}{8} f' \Omega^2 S(n, g) \qquad (2.69\,\text{a})$$

und für die Queraberration

$$\Delta y' = -\tfrac{1}{16} f' \Omega^3 S(n, g), \qquad (2.69\,\text{b})$$

wobei f' die Brennweite, $\Omega = 2h/f'$ das Öffnungsverhältnis der Linse und $S(n, g)$ eine von der Brechzahl und dem Gestaltfaktor der Linse abhängige Funktion ist, die durch den Ausdruck

$$S(n, g) = \frac{n^2}{(n-1)^2} \times \left[1 - \frac{2n+1}{2n^2}(g+1) + \frac{n+2}{4n^3}(g+1)^2\right] \qquad (2.69\,\text{c})$$

gegeben ist. Der Gestaltfaktor bestimmt die Linsenform und ist definiert durch

$$g = \frac{r_2 + r_1}{r_2 - r_1} = \frac{(r_2/r_1) + 1}{(r_2/r_1) - 1} = \frac{1 + (r_1/r_2)}{1 - (r_1/r_2)}. \qquad (2.69\,\text{d})$$

Im Bild 2.28 ist die auf die Brennweite bezogene Längsaberration $\Delta s'/f'$ in Abhängigkeit vom Gestaltfaktor g für eine Linse aus einem häufig verwendeten Glas ($n_e \approx 1{,}5$) für verschiedene Öffnungsverhältnisse grafisch dargestellt. Die ausgezogenen Linien geben den tatsächlichen Öffnungsfehler aufgrund von Strahldurchrechnungen an, während die gestrichelten Linien den nach den Gln. (2.69) berechneten Öffnungsfehler 3. Ordnung wiedergeben.

Bei Gläsern mit höherer Brechzahl wird der Öffnungsfehler geringer. Damit der Öffnungsfehler um die Hälfte vermindert werden kann, ist z.B. ein Übergang von $n = 1{,}5$ auf $n \approx 1{,}87$ erforderlich. Da die Dispersion, die die Abhängigkeit der Brechzahl von der Wellenlänge kennzeichnet, jedoch meist größer ist als die der niedrigbrechenden Gläser, ist damit der Nachteil eines größeren Farbfehlers verknüpft. Im Vergleich zu einer Linse hat ein Spiegel einen geringen Öffnungsfehler; er bildet farbfehlerfrei ab.

Eine Linsenform soll besonders hervorgehoben werden. Ihr kommt beim Aufbau von Mikroskopobjektiven und Kondensoren große Bedeutung zu. Es handelt sich um Sammellinsen mit einer aplanatischen Fläche, die dadurch ausgezeichnet ist, daß sie bei beliebig großem Öffnungswinkel ohne Öffnungsfehler abbildet und zusätzlich die Abbesche Sinusbedingung erfüllt. Die Austrittsfläche der Frontlinse eines Objektivs mit homogener Immersion wird fast immer aplana-

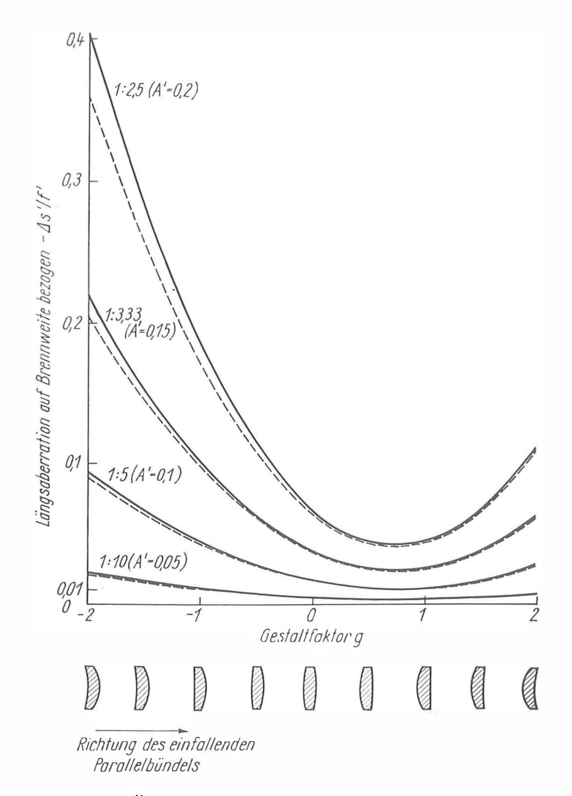


Bild 2.28. Öffnungsfehler einer (dünnen) Linse von verschiedener Gestalt für ein von links einfallendes paralleles Lichtbündel

Brechzahl $n_e = 1{,}51824$. Als Kurvenparameter sind das Öffnungsverhältnis $\Omega = 2\,h/f'$ und die entsprechende bildseitige numerische Apertur A' angegeben. Die ausgezogenen Kurven sind Längsaberrationen aufgrund von Durchrechnungen (für $f' = 100$ mm). Die gestrichelten Kurven sind Längsaberrationen aufgrund der Bildfehlertheorie 3. Ordnung

Beispiel: $f' = 100$ mm, $2h = 20$ mm, somit Öffnungsverhältnis $\Omega = 1:5$. Plankonvexe Linse mit $g = -1$; $\Delta s'/f' \approx -0{,}045$; $\Delta s' = -4{,}5$ mm. Plankonvexe Linse mit $g = +1$; $\Delta s'/f' \approx -0{,}01$; $\Delta s' = -1$ mm

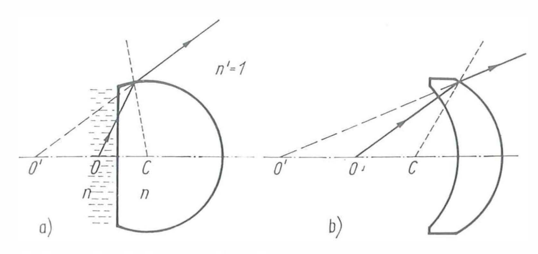


Bild 2.29. Aplanatische Linsen

a) aplanatische Frontlinse eines Immersionsobjektivs;
b) aplanatische Linse mit konzentrischer Eintrittsfläche und aplanatischer Austrittsfläche

tisch ausgeführt (Bild 2.29a). Eine aplanatische Linse mit zu O konzentrischer Eintrittsfläche und aplanatischer Austrittsfläche ist im Bild 2.29b dargestellt. Sie kann hinter der Frontlinse angeordnet werden. Für eine aplanatische Fläche gilt die Gleichung

$$ns = n's'. \tag{2.70}$$

Ihr Krümmungsradius ist gegeben durch

$$r = \frac{ns}{n + n'} = \frac{n's'}{n + n'}. \tag{2.71}$$

Die bei einer aplanatischen Fläche erfüllte Sinusbedingung Gl. (2.77) kann unter Beachtung des Abbildungsmaßstabs einer brechenden Fläche $M = ns'/n's$ sowie von Gl. (2.70) wie folgt geschrieben werden:

$$n' \sin\sigma' = n \sin\sigma \frac{1}{M} = n \sin\sigma \frac{n's}{ns'}$$

$$= n \sin\sigma \frac{n'^2}{n^2}.$$

Grenzt die aplanatische Fläche bildseitig an Luft (Bild 2.29a und b), so wird wegen $n' = 1$

$$A' = A \frac{1}{n^2}, \tag{2.72}$$

d.h., die numerische Apertur A wird durch die Brechung an der aplanatischen Fläche um den Faktor $1/n^2$ verkleinert. Bei einem Immersionsobjektiv mit $A = 1{,}35$ beträgt sie nach der aplanatischen Frontlinse nur noch 0,6, wenn ihre Brechzahl sowie die der Immersionsflüssigkeit $n = 1{,}5$ ist. Der folgende Teil des Mikroskopobjektivs braucht deshalb nur noch für die numerische Apertur 0,6 korrigiert zu sein. Gewisse Schwierigkeiten für die Korrektion ergeben sich insofern, als die Aplanasie streng nur für eine Wellenlänge gilt. Weicht der Radius vom aplanatischen ab, so ergibt sich bei benachbarten Radien Unter- oder Überkorrektion, je nachdem, ob der Radius kleiner oder größer als der aplanatische gewählt wird. Die sammelnde Wirkung bleibt dabei erhalten.

Der Öffnungsfehler eines sphärischen Spiegels vom Krümmungsradius r ist für den Sonderfall eines parallel einfallenden Lichtbündels ($s = \infty$) durch die Gleichung

$$\Delta s' = \frac{r}{2}\left(\frac{1}{\sqrt{1 - (\Omega/4)^2}} - 1\right) \tag{2.73a}$$

gegeben, die für ein beliebig großes Öffnungsverhältnis gültig ist. Den Öffnungsfehler 3. Ordnung erhält man daraus durch Reihenentwicklung als Längsaberration zu

$$\Delta s' = -\tfrac{1}{32} f \Omega^2 \tag{2.73b}$$

und als Queraberration zu

$$\Delta y' = -\tfrac{1}{64} f \Omega^3. \tag{2.73c}$$

Dabei wurde $r/2 = f$ gesetzt. Für einen Hohlspiegel ergibt sich Unterkorrektion, für einen erhabenen Spiegel Überkorrektion.

Der Öffnungsfehler einer Linse günstigster Durchbiegung ist bei $n = 1{,}5$ etwa 8,6mal und bei $n = 1{,}8$ etwa 4,6mal so groß wie der Öffnungsfehler eines Spiegels gleicher Brennweite und gleichen Öffnungsverhältnisses.

Wellenoptische Betrachtung des Öffnungsfehlers, Definitionshelligkeit

Für die Beurteilung des Öffnungsfehlers eines Mikroskopobjektivs reicht die Kenntnis seines Korrektionszustands als (geometrisch-optische) Längsaberration meist nicht aus. Es müssen wellenoptische Kriterien angewendet werden, um eine physikalisch sinnvolle Aussage über den Einfluß des Öffnungsfehlers auf die Bildgüte zu erhalten. Wellenoptische Kriterien sind das Rayleighsche $\lambda/4$-Kriterium und die Strehlsche Definitionshelligkeit, der besondere Bedeutung zukommt. Als Grundlage dient die Wellenaberration, die ein Maß für die Deformation der bildseitigen Wellenfläche im Vergleich zu einer idealen sphärischen Wellenfläche ist. Im Bild 2.30 soll W' die aus dem optischen System austretende Wellenfläche sein, die dem Achsenpunkt im Objektraum zugeordnet und aufgrund des Öffnungsfehlers des abbildenden optischen Systems deformiert ist, d.h. von der idealen Kugelgestalt abweicht. Im Bild 2.30a wird sie mit einer Kugelfläche K' verglichen, die die Wellenfläche in ihrem

Scheitel so berührt, daß der Krümmungsmittelpunkt der Kugelfläche K' mit dem Gaußschen Bildpunkt O' zusammenfällt. Die Größe l, die die Abweichung der Wellenfläche W' von der Kugelfläche K' angibt, heißt Wellenaberration. Sie ist gleichzeitig die Lichtwegdifferenz, mit der die von W' ausgehenden Elementarwellen in O' eintreffen (s.a. Abschn. 2.4.1.). Zwischen der Längsaberration $\Delta s'$ und der Wellenaberration l besteht die Beziehung

$$l(q) = \frac{1}{2} \sin^2 \sigma'_{max} \int_0^q \Delta s' \, dq, \qquad (2.74)$$

worin die Längsaberration als Funktion der Öffnungsvariablen q aufzufassen ist. q ist definiert durch

$q = \left(\frac{h}{h_{max}}\right)^2$ für einen parallel einfallenden Strahl mit der Höhe h und

$q = \left(\frac{A}{A_{max}}\right)^2$ für einen Strahl mit der numerischen Apertur A.

q ist ein quadratisches Maß für die Öffnung des Strahls und so festgelegt, daß sich für die maximale Öffnung der Wert Eins ergibt. Sind z. B. zur

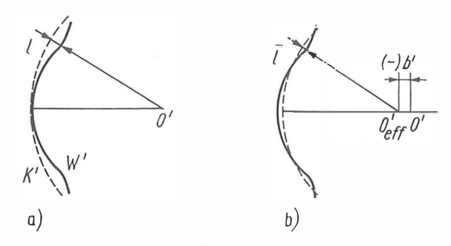


Bild 2.30. Zur Wellenaberration

W' Wellenfläche; K' Bezugs-Kugelfläche; l und $\bar{l}$ Wellenaberrationen

Kennzeichnung des Öffnungsfehlers eines Mikroskopobjektivs vier Öffnungsstrahlen durchgerechnet worden, so kann der Öffnungsfehler durch das Polynom

$$\Delta s' = a_1 q + a_2 q^2 + a_3 q^3 + a_4 q^4$$

dargestellt werden, wobei sich die Koeffizienten a_i aus den Längsaberrationen der durchgerechneten Strahlen ergeben. Bei einer deformierten Wellenfläche ist die Gaußsche Bildebene nicht mehr die günstigste Einstellebene, weil aufgrund der Wellenaberrationen die von W' ausgehenden Elementarwellen in O' nicht mehr zu maximaler Helligkeit führen. Den effektiven Bildort O'_{eff}, in dem größtmögliche Helligkeit herrscht, findet man als Krümmungsmittelpunkt der Vergleichskugelfläche K', die sich der Wellenfläche W' optimal anschmiegt (Bild 2.30b). Die Wellenaberration der Wellenfläche, bezogen auf diese günstigste Kugelfläche, nennen wir $\bar{l}$. Die günstigste Kugelfläche ergibt sich analytisch durch die Bedingung

$$\int_0^1 [\bar{l}(q)^2] \, dq = \text{Minimum}.$$

Die günstigste Einstellebene bzw. der effektive Bildort O'_{eff} ist bezüglich des Gaußschen Bildpunkts O' gegeben durch

$$b' = O'_{eff}O' = 0{,}305 \, \Delta s'_{1/4} + 0{,}343 \, \Delta s'_z + 0{,}305 \, \Delta s'_{3/4} + 0{,}024 \, \Delta s'_R, \qquad (2.75)$$

wobei $\Delta s'_{1/4}$, $\Delta s'_z$, $\Delta s'_{3/4}$ und $\Delta s'_R$ die Längsaberrationen für die q-Werte $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ und 1 sind.

Die Definitionshelligkeit η gibt das Verhältnis der Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens eines mit Aberrationen behafteten Objektivs zur entsprechenden Intensität eines sonst gleichen, aber ideal korrigierten Objektivs an. Aufgrund dieser physikalischen Bedeutung ist es einleuchtend, daß man die Definitionshelligkeit gut zur Beurteilung der Bildgüte eines Objektivs verwenden kann. Sie ist durch den Ausdruck

$$\eta = \left\{\int_0^1 \cos kl(q) \, dq\right\}^2 + \left\{\int_0^1 \sin kl(q) \, dq\right\}^2 \qquad (2.76a)$$

gegeben, wobei $k = 2\pi/\lambda$ ist. Im günstigsten Fall ist $\eta = 1$ bzw. 100% zu erwarten, wenn kein Öffnungsfehler vorliegt. Weil in diesem Fall die Wellenaberrationen $l(q)$ über die gesamte Wellenfläche gleich Null sind, ist dieses Ergebnis aus Gl. (2.76a) sofort evident. Bei vorhandenem Öffnungsfehler ergeben sich von Null verschiedene Wellenaberrationen, und man erhält $\eta < 1$. Falls keine spürbare Verschlechterung der Bildqualität auftreten soll, ist als untere Grenze für die Definitionshelligkeit $\eta = 0{,}8$ bzw. 80% zu wählen. Bei einfachem Verlauf der Aberrationskurve, z. B. beim Öffnungsfehler 3. Ordnung, entspricht die 80%-Grenze dem $\lambda/4$-Kriterium. Bei komplizierterem Öffnungsfehlerverlauf verdient die Definitionshelligkeit den Vorzug.

Bei kleinen Wellenaberrationen kann man den Ausdruck für die Definitionshelligkeit durch eine

Reihenentwicklung wesentlich vereinfachen. Es gilt dann näherungsweise

$$\eta = \left\{1 - \frac{1}{2} k^2 \int_0^1 l^2 \, dq\right\}^2 \quad \text{oder}$$

$$\eta \approx 1 - k^2 \int_0^1 l^2 \, dq. \tag{2.76b}$$

Die Berechnung der Definitionshelligkeit kann unmittelbar aus den Längs- oder Queraberrationen erfolgen [42].

Eine weitere Möglichkeit, den Korrektionszustand eines optischen Systems darzustellen, ist durch die Kontrastübertragungsfunktion gegeben. Sie findet besonders bei solchen Objektiven Anwendung, bei deren Abbildung größere Wellenaberrationen als bei Mikroskopobjektiven auftreten (z.B. bei fotografischen Objektiven). Die Kontrastübertragungsfunktion gibt den bei der Abbildung entstehenden Kontrast gitterähnlicher Strukturen unterschiedlicher Gitterkonstante im Vergleich zum Objektkontrast an. Der reziproke Wert der Gitterkonstante ergibt die Anzahl Linien je Millimeter und wird Raumfrequenz oder Ortsfrequenz genannt. Je nach Betrag und Art des Öffnungsfehlerverlaufs ergibt sich ein unterschiedlicher Verlauf der Kontrastübertragungsfunktion in Abhängigkeit von der Raumfrequenz. Zur näheren Information über die Kontrastübertragungsfunktion muß auf die einschlägige Literatur verwiesen werden [24] [29]. Eine Anwendung der Kontrastübertragungstheorie auf Mikroskopobjektive ist möglich [38]. Zwischen Kontrastübertragungsfunktion und Definitionshelligkeit besteht der Zusammenhang, daß die Definitionshelligkeit als ein integraler Ausdruck für alle möglichen Raumfrequenzen aufgefaßt werden kann. Die größtmögliche Raumfrequenz entspricht der theoretischen Auflösungsgrenze.

2.4.3.2. Koma

Die Koma ist ein asymmetrischer Bildfehler, der bei zentrierten optischen Systemen nur bei der Abbildung außeraxialer Objektpunkte auftritt. Der Bildfehler kommt dadurch zustande, daß der Schnittpunkt von zwei Meridionalstrahlen, die zur gleichen Öffnungszone gehören, nicht auf dem Hauptstrahl liegt, sondern seitlich davon. Es entsteht nur eine kaustische Linie, während der abgewandte Teil eine geringere Dichte von Strahlen aufweist. In vereinfachter geometrisch-optischer Auffassung kann man das so interpretieren, daß sich in einer Auffangebene rechtwinklig zur optischen Achse die kaustische Linie als Lichtkonzentration darstellt, während der abgewandte Teil als Lichtschweif in Erscheinung tritt. In der Beugungsfigur einer Punktlichtquelle, z.B. im Sterntest, entspricht der Lichtkonzentration das zentrale Beugungsscheibchen, und der Lichtschweif weist eine Ringstruktur auf. Wie in den Bildern 2.31a und b dargestellt, kann der Komafehler als Innen- und Außenkoma auftreten. Die Unsymmetrie der Strahlenvereinigung ist auf die Meridionalebene beschränkt, die im Bild mit der Zeichenebene übereinstimmt. Zur Meridionalebene selbst ist die Komaerscheinung symmetrisch. Das bedeutet, daß bei einem optischen

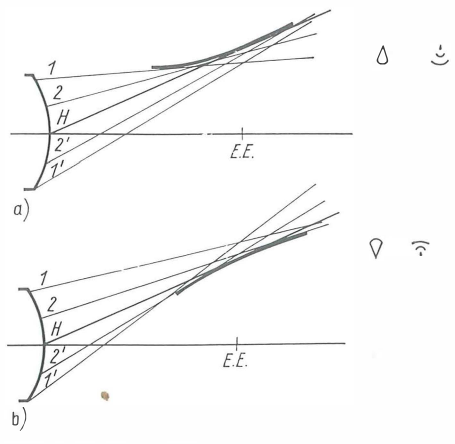


Bild 2.31. Komafehler

a) Innenkoma;
b) Außenkoma;
rechts: geometrisch optische Zerstreuungsfigur und Beugungsfigur

System die Komaschweife in der Auffangebene radial zur Bildmitte hin (Innenkoma) oder von der Bildmitte weg (Außenkoma) verlaufen und zu einem Durchmesser des Bildfelds, der als Schnittlinie einer Meridionalebene aufzufassen ist, symmetrisch liegen.

Bei der Korrektion von Mikroskopobjektiven spielt die Beseitigung der Koma eine wesentliche Rolle. In diesem Zusammenhang ist es von großer Bedeutung, daß bei der Erfüllung der von *Abbe* angegebenen Sinusbedingung die komafreie Abbildung außeraxialer Objektpunkte gewährleistet ist, die dem Achsenpunkt benachbart sind. Die Abbesche Sinusbedingung lautet für endliche Abbildung

$$\frac{n \sin \sigma}{n' \sin \sigma'} = \frac{y'}{y} = M = \text{const}, \tag{2.77}$$

für den Fall eines parallel einfallenden Strahlenbündels

$$\frac{h_1}{\sin \sigma'} = f' = \text{const} \quad \text{[s. Gl. (2.3 b)]}$$

und für den Fall eines parallel austretenden Strahlenbündels

$$\frac{h_k}{\sin \sigma} = f = \text{const} \quad \text{[s. Gl. (2.3 b)].}$$

Die letztere Beziehung kann man so umformen, daß siefür ein Mikroskopobjektiv mit unendlicher Bildweite besonders nützlich ist. In Gl. (2.6) setzt man $n' = 1$ und läßt das negative Vorzeichen weg

$$\frac{h_k}{n \sin \sigma} = f' = \text{const}.$$

2.4.3.3. Zweischalenfehler (Astigmatismus)

Die Abbildung eines außeraxialen Objektpunkts ist im allgemeinen astigmatisch. Das bedeutet, daß die Abbildung auch bei kleinem Öffnungswinkel des abbildenden Strahlenbündels nicht punktförmig erfolgt, sondern daß zwei Bildlinien entstehen, die aufeinander senkrecht stehen und voneinander einen Abstand haben, den man astigmatische Differenz oder Astigmatismus nennt (Bild 2.32). Die Ursache liegt darin, daß das in der Meridionalebene *M–M* verlaufende meridionale Strahlenbündel einer anderen brechenden Wirkung unterliegt als das im rechtwinklig dazu liegenden Sagittalschnitt *S–S* verlaufende sagittale Strahlenbündel. Der Schnittpunkt des meridionalen Strahlenbündels auf dem Hauptstrahl wird meridionaler – auch tangentialer – Bildpunkt B'_m genannt. Durch ihn verläuft eine Bildlinie im Sagittalschnitt. Der Schnittpunkt des sagittalen Strahlenbündels auf dem Hauptstrahl heißt sagittaler Bildpunkt B'_s. Durch ihn verläuft eine Bildlinie im Meridionalschnitt. In der Mitte zwischen B'_s und B'_m ist der Querschnitt des Strahlenbündels kreisförmig, an anderen Stellen elliptisch.

Ein Fadenkreuz, das sich am Ort des außeraxialen Objektpunkts B befindet, wird bei vorhandenem Astigmatismus so abgebildet, daß der Strich am Ort des meridionalen Bildpunkts in sagittaler

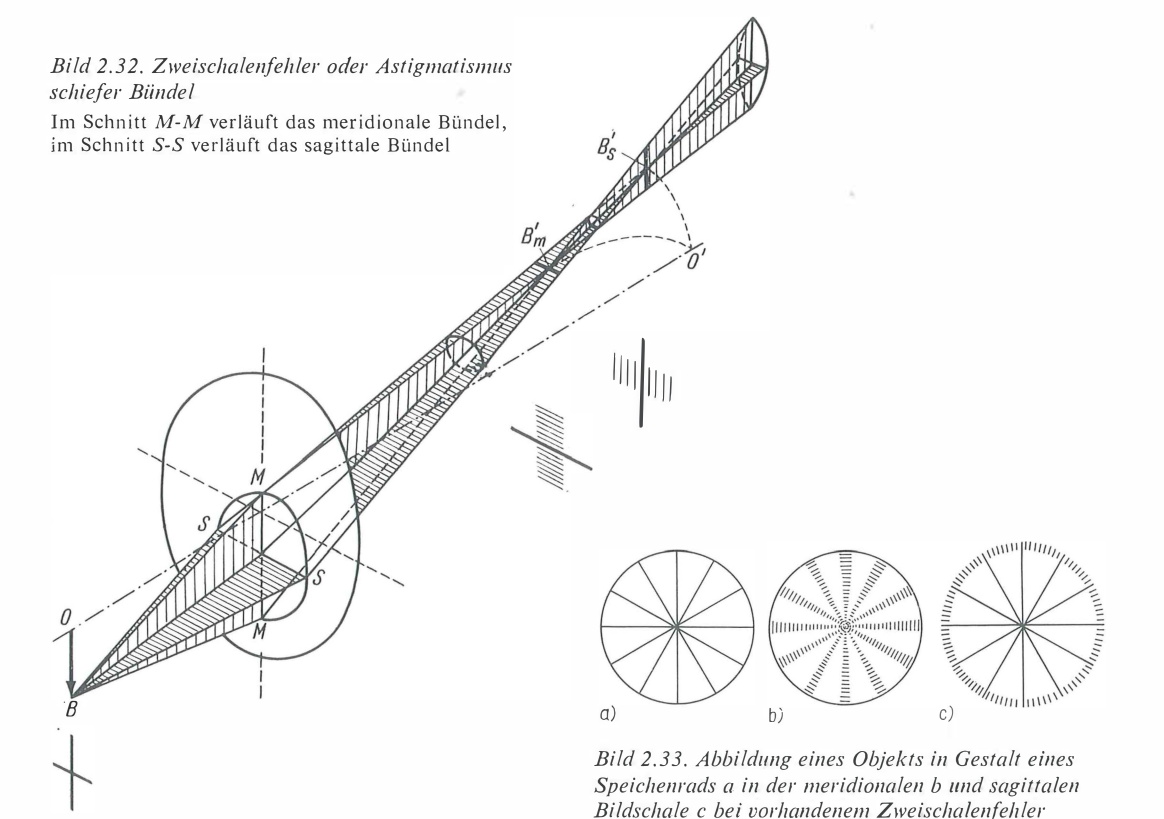


Bild 2.32. Zweischalenfehler oder Astigmatismus schiefer Bündel
Im Schnitt *M-M* verläuft das meridionale Bündel, im Schnitt *S-S* verläuft das sagittale Bündel

Bild 2.33. Abbildung eines Objekts in Gestalt eines Speichenrads a in der meridionalen b und sagittalen Bildschale c bei vorhandenem Zweischalenfehler

Richtung scharf und in meridionaler Richtung unscharf erscheint. Am Ort des sagittalen Bildpunkts ist es umgekehrt. Durch aufeinanderfolgende Einstellungen auf die beiden Bildorte läßt sich der Astigmatismus messen.
Die bei der Abbildung von Objektpunkten eines ebenen Objektfelds entstehenden meridionalen und sagittalen Bildpunkte liegen auf je einer gekrümmten, zur optischen Achse rotationssymmetrischen Fläche, die man die meridionale bzw. sagittale Bildschale nennt. Beide Bildschalen berühren sich im Gaußschen Bildpunkt O', da dieser als Bildpunkt des auf der optischen Achse gelegenen Objektpunkts O ohne Astigmatismus abgebildet wird. Im Hinblick auf den z.B. bei optischen Systemen mit Zylinderlinsen oder bei dezentrierten optischen Systemen auftretenden axialen Astigmatismus ist es besser, den beschriebenen Bildfehler als Zweischalenfehler oder als Astigmatismus schiefer Bündel zu bezeichnen. Wenn man die beiden Schalen des Zweischalenfehlers einzeln betrachtet, spricht man von sagittaler und meridionaler Bildfeldwölbung. Ein Objekt in Gestalt eines Speichenrads wird in der meridionalen Bildschale so abgebildet, daß die in meridionaler Richtung liegenden Speichen unscharf und die Felge scharf erscheint, während in der sagittalen Bildschale die Speichen scharf und die Felge unscharf abgebildet werden (Bild 2.33).
Für den Zweischalenfehler sowie die meridionale und die sagittale Bildfeldwölbung ist eine grafische Darstellung üblich, bei der in der Ordinatenrichtung die Bildhöhe und in Richtung der Abszisse die Orte der sagittalen und meridionalen Bildpunkte aufgetragen werden (Bild 2.34).

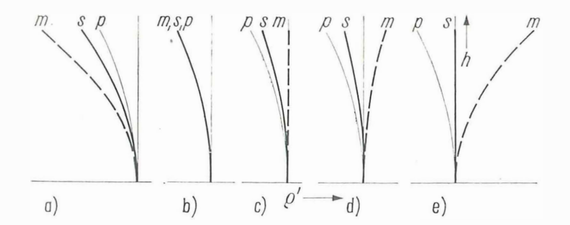


Bild 2.34. Grafische Darstellung der sagittalen und meridionalen Bildfeldwölbung für ein optisches System mit gleicher Petzval-Summe, gekennzeichnet durch gleiche Lage der Petzval-Fläche p, jedoch unterschiedlich korrigiertem Zweischalenfehler

a) unterkorrigierter Zweischalenfehler;
b) behobener Zweischalenfehler;
c) meridionale Schale geebnet;
d) übertragene Bildfeldebnung;
e) sagittale Schale geebnet

2.4.3.4. Bildfeldwölbung

Bei beseitigtem Zweischalenfehler werden die Objektpunkte eines ebenen Objekts so abgebildet, daß ihre Bildpunkte auf einer gekrümmten (zur optischen Achse rotationssymmetrischen) Fläche liegen. Der Bildfehler, der die Abweichung dieser Bildfläche von der idealen Gaußschen Bildebene angibt, heißt Bildfeldwölbung. Die Bildfeldwölbung bewirkt, daß bei Scharfeinstellung auf die Bildmitte das Bild nach dem Rand hin zunehmend unscharf erscheint. Durch Nachfokussieren lassen sich Details am Rande des Bildfelds scharf einstellen. Mit Hilfe der Feineinstellung am Mikroskop läßt sich die Bildfeldwölbung messen. Ist die Scharfeinstellung durch Nachfokussieren nicht möglich, so sind außer der Bildfeldwölbung auch andere Bildfehler wirksam, gewöhnlich Koma oder/und Zweischalenfehler.
Der Zweischalenfehler und die Bildfeldwölbung sind miteinander eng verwandte Bildfehler. Von den drei Bildfehlern sagittale Bildfeldwölbung, meridionale Bildfeldwölbung und Zweischalenfehler, aufgefaßt als astigmatische Differenz, sind je zwei ausreichend, um den dritten zu bestimmen. Die bei beseitigtem Zweischalenfehler verbleibende Bildschale nennt man auch Petzval-Fläche. Sie kennzeichnet die (reine) Bildfeldwölbung.
Die Beseitigung der Bildfeldwölbung nennt man Bildfeldebnung. Während sich der Zweischalenfehler bei der Berechnung eines Mikroskopobjektivs leicht beheben läßt, erfordert die Bildfeldebnung erheblichen Aufwand. Bei strenger Bildfeldebnung und gleichzeitig behobenem Zweischalenfehler muß – innerhalb des Seidelschen Gebiets – die Bedingung erfüllt sein, daß die sog. Petzvalsche Summe Null ergeben muß. Die 1843 von *Petzval* aufgestellte Bedingung hat bei der Entwicklung von Mikroskopobjektiven mit geebnetem Bildfeld, den Planachromaten und Planapochromaten, außerordentliche Bedeutung erlangt. Aufgrund der geringen Bildfeldwinkel bei einem Mikroskopobjektiv kann für Zweischalenfehler und Bildfeldwölbung die Gültigkeit der Seidelschen Theorie, und damit die Gültigkeit der Petzvalschen Bedingung, weitgehend angenommen werden.
Die Petzvalsche Summe $\sum P_\nu$ setzt sich zusammen aus den Petzval-Koeffizienten P_ν der einzelnen optischen Flächen. Es gilt für eine brechende Fläche

$$P_\nu = -\frac{1}{r_\nu}\left(\frac{1}{n'_\nu} - \frac{1}{n_\nu}\right) \qquad (2.78\,a)$$

und für eine spiegelnde Fläche

$$P_\nu = +\frac{2}{n_\nu r_\nu}. \tag{2.78b}$$

Für eine beiderseits von Luft begrenzte Linse mit der Brechzahl n folgt aus Gl. (2.78a)

$$\sum P_\nu = \frac{n-1}{n}\left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2}\right) \tag{2.79}$$

(Einzellinse).
Durch Vergleich mit der Gleichung für die Brennweite einer unendlich dünnen Linse erhält man

$$\sum P_\nu = \frac{1}{nf'} \tag{2.80a}$$

(dünne Einzellinse)
und für ein optisches System aus k dünnen Einzellinsen

$$\sum P_\nu = \frac{1}{n_1 f'_1} + \frac{1}{n_2 f'_2} + \dots + \frac{1}{n_k f'_k} \tag{2.80b}$$

(System aus dünnen Einzellinsen).
Bei beseitigtem Zweischalenfehler beträgt der Krümmungsradius der verbleibenden Bildschale, d.h. der Petzval-Fläche,

$$r'_P = -\frac{1}{\sum P_\nu}. \tag{2.81a}$$

Im Fall einer dünnen Einzellinse führt dies zu

$$r'_P = -nf', \tag{2.81b}$$

d.h., bis auf das Vorzeichen und die Brechzahl stimmt der Krümmungsradius der Bildschale mit der Brennweite der Linse überein. Je kürzer die Brennweite ist, um so stärker ist die Bildfeldwölbung. Bei Sammellinsen ist die hohle Seite der gewölbten Bildschale der Linse zugewandt. Bei Zerstreuungslinsen ist der Krümmungssinn entgegengesetzt. Durch Glas mit höherer Brechzahl läßt sich die Bildfeldwölbung bei gleicher Brennweite der abbildenden Linse verbessern. Diese Aussagen treffen auch für ein optisches System zu (z.B. für Achromate und Apochromate), wenn keine besonderen Maßnahmen zur Bildfeldebnung ergriffen werden.
Eine strenge Bildfeldebnung erfordert $\sum P_\nu = 0$. Wie läßt sich das bei einer sammelnden Linse oder einem sammelnden optischen System erreichen? Beim Übergang von einer dünnen bikonvexen Linse ($r_1 > 0$, $r_2 < 0$) zu einer dicken Linse, unter Beibehaltung ihrer Radien, nimmt die Brennweite der Linse zu, und ihre brechende Wirkung verringert sich. Um die brechende Wirkung zu erhalten, müssen die optischen Flächen

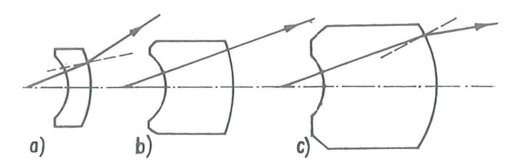


Bild 2.35. Strahlenverlauf an meniskenförmigen Linsen mit gleichen Radien, jedoch unterschiedlicher Dicke
a) dünner Meniskus mit zerstreuender Wirkung;
b) Meniskus ohne brechende Wirkung;
c) dicker Meniskus mit sammelnder Wirkung

stärker gekrümmt werden, was nach Gl. (2.79) zu einer Erhöhung der Petzval-Summe führt und dem beabsichtigten Zweck entgegenwirkt. Beim Übergang von einem dünnen positiven Meniskus zu einem dicken, unter Beibehaltung der Radien, wird die Brechkraft der Linse stärker. Bei gleicher brechender Wirkung des dicken Meniskus sind die optischen Flächen weniger zu krümmen, wodurch der gewünschte Effekt einer Verringerung der (positiven) Petzval-Summe erreicht wird. Entscheidend ist jedoch die Tatsache, daß beim Übergang von einem dünnen negativen Meniskus, dem ein negatives Vorzeichen der Petzval-Summe nach Gl. (2.80a) entspricht, zu einem dicken Meniskus von einer bestimmten Dicke ab $\{$für $d > n(r_1 - r_2)/(n-1)\}$ eine positive Brennweite entsteht (Bild 2.35). Ein solcher dicker Meniskus hat deshalb die brechende Wirkung einer Sammellinse, wogegen seiner Petzval-Summe das Vorzeichen einer Negativlinse zukommt. In Kombination mit weiteren Positivlinsen ist ein dicker Meniskus geeignet, die Petzval-Summe des gesamten optischen Systems Null zu setzen. *Boegehold* hat auf diese Zusammenhänge aufmerksam gemacht und mit dicken Menisken die ersten Mikroskopobjektive mit geebnetem Bildfeld berechnet [14] bis [17].

2.4.3.5. Verzeichnung

Bei einer Abbildung tritt Verzeichnung auf, wenn der Abbildungsmaßstab (oder die Vergrößerung) für unterschiedliche Objektgrößen verschieden ist. Dies führt zu Gestaltänderungen abgebildeter Objekte.
Im Bild 2.36 durchstößt der vom außeraxialen Objektpunkt B ausgehende Hauptstrahl die Bildebene nicht im Gaußschen Bildpunkt B', sondern in einem davon abweichenden Bildpunkt $\tilde{B}'$, zu dem die Bildgröße $\tilde{y}'$ gehört. Der zugehörige Abbildungsmaßstab ist

$$\tilde{M} = \frac{\tilde{y}'}{y},$$

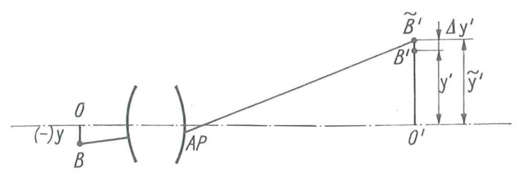


Bild 2.36. Zur Verzeichnung

während der (Gaußsche) Abbildungsmaßstab nach Gl. (2.7)

$$M = \frac{y'}{y}$$

ist. Die Verzeichnung kann man als die relative Abweichung des Abbildungsmaßstabs definieren:

$$\text{Verzeichnung} = \frac{\tilde{M} - M}{M}. \tag{2.82a}$$

Die Abbildung ist verzeichnungsfrei, wenn der Abbildungsmaßstab über das gesamte Bildfeld gleich dem (Gaußschen) Abbildungsmaßstab M ist. Durch Einsetzen der Beziehungen für M und $\tilde{M}$ ergibt sich die Verzeichnung in der gebräuchlichen Form

$$\text{Verzeichnung} = \frac{\tilde{y}' - y'}{y'} = \frac{\Delta y'}{y'} \tag{2.82b}$$

und in Prozent ausgedrückt

$$\text{Verzeichnung} = \frac{\Delta y'}{y'}\,100. \tag{2.82c}$$

Die Verzeichnung ändert sich mit der Bildgröße. Im Seidelschen Gebiet nimmt $\Delta y'$ mit der dritten Potenz von y' zu, so daß die Verzeichnung eine quadratische Funktion der Bildgröße ist (Verzeichnung proportional y'^2). Im Bereich der Bildmitte tritt praktisch keine Verzeichnung auf. Nach dem Rande des Bildfelds hin nimmt sie zu. Die Gestaltänderung bei der Abbildung eines Objekts ist deshalb im Bereich der Bildmitte gering, am Bildrand stärker.

Nimmt der Abbildungsmaßstab mit zunehmender Objektgröße zu (positive Verzeichnung), so wird ein Quadrat in Gestalt eines Kissens abgebildet. Im Bild 2.37 ist diese Art der Verzeichnung deshalb als kissenförmige Verzeichnung dargestellt. Im umgekehrten Fall ergibt sich tonnenförmige Verzeichnung (Bild 2.37c). Durch Änderung des Hauptstrahlverlaufs oder – was dasselbe bedeutet – durch Änderung der Lage der Eintrittspupille bzw. der Austrittspupille kann man auf den Betrag und die Art der Verzeichnung Einfluß nehmen. In der Mikroskopie stört im allgemeinen eine geringe Verzeichnung nicht.

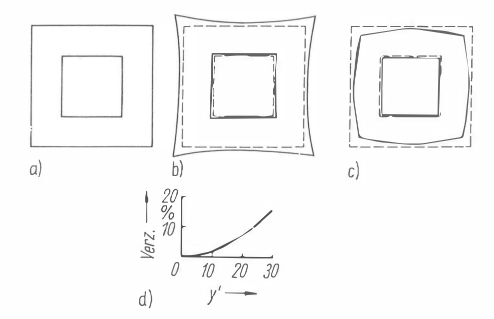


Bild 2.37. Abbildung eines Quadrats

a) ohne Verzeichnung;
b) bei kissenförmiger Verzeichnung;
c) bei tonnenförmiger Verzeichnung;
d) gibt die Größe der Verzeichnung in Abhängigkeit von der Bildgröße an

2.4.4. Chromatische Abbildungsfehler

Farbfehler oder chromatische Abbildungsfehler entstehen dadurch, daß sich die Brechzahlen aller durchlässigen Medien, aus denen brechende optische Bauelemente bestehen, mit der Wellenlänge ändern. Die Erscheinung, daß die Brechzahl n eines Stoffs von der Wellenlänge abhängig ist, nennt man Dispersion. Wenn eine Abgrenzung gegenüber anderen Abhängigkeiten von der Wellenlänge erforderlich ist, spricht man von der Brechungsdispersion. Die Dispersion (Brechungsdispersion) ist die Ursache für die Farbfehler. Im Anwendungsbereich der brechenden Medien nimmt die Brechzahl mit zunehmender Wellenlänge ab (normale Dispersion).

Für eine Sammellinse sind die aufgrund der Dispersion entstehenden Farbfehler im Bild 2.38 dargestellt. Von einem Achsenpunkt O entsteht nicht mehr, wie bei monochromatischer Strahlung, ein Bild O', sondern eine Reihe von Bildern O'. Für jede Wellenlänge, die in der abbildenden Strahlung enthalten ist, ergibt sich ein Bild. Infolge der größer werdenden Brechzahl beim Übergang von rotem zu violettem Licht hat das violette Bild die kürzeste, das rote Bild die längste Schnittweite (primäres Spektrum). Bei einer Zerstreuungslinse

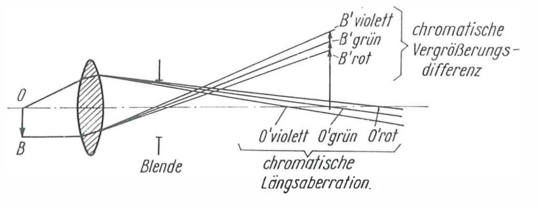


Bild 2.38. Chromatische Abbildungsfehler

ist die Farbfolge umgekehrt. Die Differenz der Schnittweiten für verschiedene Wellenlängen bzw. Farben nennt man Farblängsfehler (chromatische Längsaberration). Der von dem außeraxialen Objektpunkt ausgehende und parallel einfallende Hauptstrahl wird durch die prismatische Wirkung der Linse spektral zerlegt, so daß die durch ihn bestimmten Bildgrößen y' von der Wellenlänge abhängig werden. Es entsteht ein von der Wellenlänge abhängiger Abbildungsmaßstab. Diesen Farbfehler nennt man Farbvergrößerungsfehler (chromatische Vergrößerungsdifferenz).

Außer diesen beiden Farbfehlern, die bereits im Gaußschen Raum auftreten, zeigen die im Abschn. 2.4.3. behandelten monochromatischen Bildfehler (Öffnungsfehler, Koma, Zweischalenfehler, Bildfeldwölbung, Verzeichnung) größere oder kleinere Änderungen, wenn man die Wellenlänge variiert: chromatische Variation der monochromatischen Abbildungsfehler. Von diesen Farbfehlern kommt der chromatischen Variation des Öffnungsfehlers (Gauß-Fehler) größere Bedeutung zu.

Achromasie

Bei der Farbkorrektion optischer Systeme spielt die Beseitigung des Farblängsfehlers die wichtigste Rolle. Bleibt er unkorrigiert, so wird ein Objektdetail in der Bildmitte mit farbigen Säumen abgebildet.

Durch Kombination einer Sammellinse mit einer Zerstreuungslinse kann man den Farblängsfehler für zwei Farben beseitigen. Es ist üblich, hierfür die beiden Farben mit den Wellenlängen $\lambda = 656$ nm (C-Linie, Rot) und $\lambda = 486$ nm, (F-Linie, Blau) oder neuerdings $\lambda = 644$ nm (C'-Linie, Rot) und $\lambda = 480$ nm (F'-Linie, Blau) zu benutzen, die aufgrund der spektralen Hellempfindlichkeitskurve des Auges noch genügend hell empfunden werden. Als mittlere Farbe ist die Wellenlänge $\lambda = 546$ nm (e-Linie, Grün) üblich; früher wurde die gelbe d-Linie benutzt. Die Achromasiebedingung für die beiden Farben C' und F' läßt sich am einfachsten durch die Abbesche Zahl formulieren. Die Abbesche Zahl

$$\nu = \frac{n_e - 1}{n_{F'} - n_{C'}} \tag{2.83}$$

kennzeichnet die Dispersion eines Glases oder eines anderen Mediums. Je größer die Differenz $n_{F'} - n_{C'}$ ist, die man auch Grunddispersion oder mittlere Dispersion (mittlere Farbenzerstreuung) nennt, um so kleiner ist die Abbesche Zahl. Bei geringer Dispersion ist die Abbesche Zahl groß.

In den Glaskatalogen der Hersteller optischen Glases werden die Gläser im (n, ν)-Diagramm dargestellt, das die Zuordnung der Brechzahl n zum ν-Wert jedes Glases angibt.

Als Achromasiebedingung für zwei dünne eng benachbarte Linsen (Kittglied) mit den Brennweiten f_1' und f_2' sowie den Abbeschen Zahlen ν_1 und ν_2 ergibt sich

$$\nu_1 f_1' + \nu_2 f_2' = 0. \tag{2.84}$$

Bezeichnet man die Gesamtbrennweite des achromatischen Glieds mit f', so erhält man die Einzelbrennweiten aus den Gleichungen

$$f_1' = \frac{\nu_1 - \nu_2}{\nu_1} f' \quad \text{und} \quad f_2' = -\frac{\nu_1 - \nu_2}{\nu_2} f'. \tag{2.85}$$

Es sei ein sammelndes optisches System mit $f' > 0$ zu achromatisieren, d.h. gleiche Schnittweite für C' und F' herzustellen. Mit $\nu_1 > \nu_2$ wird f_1' positiv und f_2' negativ. Das ergibt als erste Linse eine Sammellinse aus Glas geringer Dispersion (z.B. Kronglas) und als zweite Linse eine Zerstreuungslinse aus Glas hoher Dispersion (z.B. Flintglas). Für $\nu_1 < \nu_2$ wird f_1' negativ und f_2' positiv, was zu einer Vertauschung der Linsen führt. Ein achromatisches negatives System ($f' < 0$) enthält eine Zerstreuungslinse aus Glas geringer Dispersion (z.B. Kronglas) und eine Sammellinse aus Glas hoher Dispersion (z.B. Flintglas).

Trägt man bei einem achromatischen System die Schnittweiten der Gaußschen Bildorte für die verschiedenen Wellenlängen in ein Diagramm ein (Bild 2.39), so erhält man den verbleibenden Farblängsfehler als Farbkurve in der Art der Kurve *1*. Um den bei der Abbildung wirksamen Farbzustand darzustellen, ist es besser, die Lage der für jede Wellenlänge günstigsten Einstellebene bzw. die effektiven Bildorte O'_{eff} in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufzutragen. Bei achromatischem Korrektionszustand eines sammelnden optischen Systems fallen die Bildorte von C' und F' nahezu zusammen, während für zwischenliegende Farben (z.B. für e) der Bildort näher zum optischen System hin, nach dem Roten sowie nach dem Violetten zu gelegenen Farben der Bildort weiter vom optischen System entfernt liegt. Im Vergleich zu dem primären Spektrum eines farbig nicht korrigierten Systems (Bild 2.38) bezeichnet man die Restfarben eines achromatischen Systems als „sekundäres Spektrum". Bei quantitativer Auffassung dieses Begriffs versteht man darunter die Abweichung des Bildorts von e gegenüber C' und F'.

Apochromasie

Durch Verwendung von Gläsern und anderen optischen Medien mit speziellem Dispersionsverlauf läßt sich erreichen, daß entweder das sekundäre Spektrum vermindert wird (Kurve *2*) oder ein apochromatischer Korrektionszustand (Kurve *3* im Bild 2.39) erzielt wird, der dadurch ausgezeichnet ist, daß für drei Wellenlängen der Bildort übereinstimmt. Die dann noch verbleibenden sehr geringen Farbreste könnte man sinngemäß als „tertiäres Spektrum" bezeichnen, wie es hin und wieder geschieht.
Sowohl bei optischen Systemen mit vermindertem sekundärem Spektrum als auch bei apochromatischer Korrektion spielt Flußspat (CaF_2) als Linsenmaterial eine ausschlaggebende Rolle.
Eine wichtige Größe zur Kennzeichnung der Dispersion eines optischen Mediums ist außer der Abbeschen Zahl ν die relative Teildispersion

$$\vartheta_{\lambda 1, \lambda 2} = \frac{n_{\lambda 1} - n_{\lambda 2}}{n_{F'} - n_{C'}}, \tag{2.86}$$

die in den Glaskatalogen der Glashersteller für verschiedene Teildispersionen $(n_{\lambda 1} - n_{\lambda 2})$ angegeben wird.
Bei apochromatischer Korrektion zweier dünner, eng benachbarter Linsen müßte außer der Achromasiebedingung Gl. (2.84) zusätzlich die Bedingung

$$\frac{1}{\vartheta_1} \nu_1 f_1' + \frac{1}{\vartheta_2} \nu_2 f_2' = 0 \tag{2.87}$$

erfüllt sein.

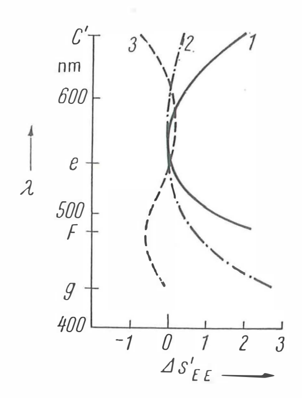


Bild 2.39. Farblängsfehler bei achromatischer 1, halbapochromatischer 2 und apochromatischer Korrektion 3

Das ist nur möglich, wenn die relativen Teildispersionen ϑ_1 und ϑ_2 für beide Linsen gleich groß sind. Da die ϑ-Werte fast aller Gläser annähernd längs einer Geraden $\vartheta = A\nu + B$ wie im Bild 2.40

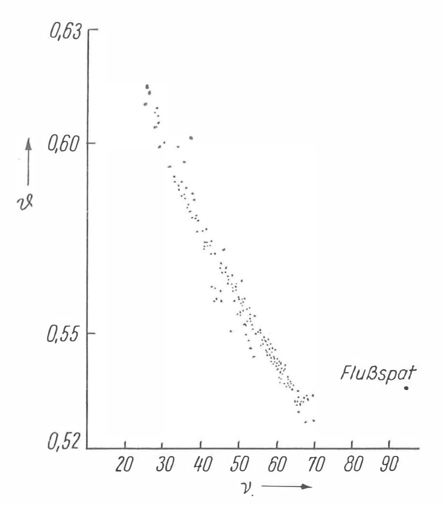


Bild 2.40. Relative Teildispersion ϑ in Abhängigkeit von der Abbeschen Zahl ν für optische Gläser

Die extreme Lage von Flußspat ist für die apochromatische Korrektion wesentlich

angeordnet sind, ist die Gleichheit zweier ϑ-Werte für Gläser mit größeren Unterschieden in den ν-Werten, was für die Achromasie wichtig ist, in den meisten Fällen nicht möglich. Durch die extreme ϑ-Lage von Flußspat wird die Bedeutung dieses Materials für die apochromatische Korrektion verständlich.

2.5. Mikroskopobjektive

2.5.1. Allgemeines

Die Mikroskopobjektive sind im zusammengesetzten Mikroskop die optischen Systeme, die die spezifische Objektivfunktion ausüben. In diesem Abschnitt wird das Mikroskopobjektiv in seiner technischen Realisierung betrachtet. Die Angaben über technische Einzelheiten beziehen sich auf Mikroskopobjektive des VEB Carl Zeiss JENA. Andere Hersteller werden besonders erwähnt.
Mikroskopobjektive sowie optische Systeme für die Mikroskopie sowjetischer Herkunft werden beschrieben in [45].

2.5.1.1. Anpassungsmaße

Mikroskopobjektive sind wesentliche Bestandteile des Mikroskops. Meist gehören mehrere Mikroskopobjektive zu einer Objektivreihe, die durch abgestufte Vergrößerungen bzw. Abbildungsmaßstäbe und numerische Aperturen gekennzeichnet ist. Die Verwendung der Objektive am Mikroskop und die zu fordernde Austauschbarkeit der Mikroskopobjektive einer Objektivreihe untereinander führen dazu, daß bestimmte konstruktive Forderungen eingehalten werden müssen.

Im Bild 2.41 sind die maßgeblichen konstruktiven Größen für ein Objektiv mit endlicher Bildweite (*a*) und für ein Objektiv mit unendlicher Bildweite (*b*) dargestellt.

Den Abstand von der Objektebene bis zur Objektiv-Anlagefläche bezeichnet man als Abgleichlänge. Abgesehen von einigen Ausnahmen, beträgt die Abgleichlänge 45 mm. Die gleiche Abgleichlänge verwenden auch die meisten anderen Hersteller. Früher betrug die Abgleichlänge bei Zeiss-Objektiven 33,65 mm. Objektive für endliche Bildweite werden durch die Tubusweglänge gekennzeichnet, die gleich dem Abstand zwischen Objektiv-Anlagefläche und Okular-Anlagefläche eines geraden Tubus ist. Sie beträgt

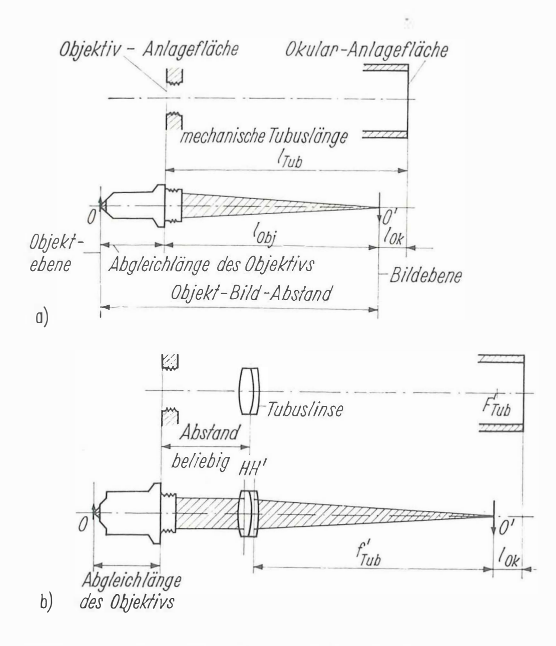


Bild 2.41. Maßgebliche konstruktive Größen für Mikroskopobjektive

160 mm und ist aufgraviert. Einige Hersteller verwenden auch andere Tubusweglängen.

Da das vom Objektiv erzeugte Bild um die Strecke l_{Ok} vor der Okular-Anlagefläche entsteht, hängt die für die Korrektion maßgebliche Objekt-Bild-Entfernung OO' nur mittelbar von der Tubusweglänge ab. Als Abgleichlänge des Okulars (Abstand Zwischenbild O' bis Okular-Anlagefläche) kann l_{Ok} aufgefaßt werden und beträgt 13 mm. Damit ergibt sich die Objekt-Bild-Entfernung der Objektive mit 45 mm Abgleichlänge zu $45 + 160 - 13 = 192$ mm. Da die Abgleichlänge der Okulare l_{Ok} bei verschiedenen Herstellern unterschiedlich ist, ergeben sich Unterschiede in den Objekt-Bild-Entfernungen der Objektive.

Die Mikroskope sind so konstruiert, daß sie entweder Objektive mit endlicher oder solche mit unendlicher Bildweite erfordern. Damit keine Verwechslung vorkommt, werden die beiden Objektivarten mit unterschiedlichen Anschlußgewinden versehen. Objektive für Tubuslänge 160 mm haben Gewinde W $0{,}8'' \times \frac{1}{36}''$ (sog. englisches Gewinde). Objektive für Tubuslänge ∞ haben Gewinde M $19 \times 0{,}75$. Objektive mit unendlicher Bildweite entsprechen der Abbeschen Zerlegung (s. Abschn. 2.2.5. u. Bild 2.12). Sie haben den Vorteil, daß der Abstand zwischen Objektiv und Tubuslinse verändert werden kann, ohne daß sich ein Einfluß auf die Vergrößerung ergibt. Die Konstruktion von Auflichtmikroskopen und einigen Spezialmikroskopen kann dadurch vorteilhaft ausgeführt werden. Die bei Objektiven mit unendlicher Bildweite erforderliche Tubuslinse kann sich jedoch auch nachteilig auswirken. Bei einfachen Mikroskopen ergibt sich ein zu hoher Aufwand, bei Mikroskopen für einen großen Spektralbereich beeinträchtigt die Tubuslinse den Korrektionszustand der Spezialobjektive.

In Tafel 2.6 werden die Anpassungsmaße für Mikroskopobjektive verschiedener Hersteller angegeben. Die Tafel beansprucht keine Vollständigkeit.

2.5.1.2. Vergrößerung bzw. Abbildungsmaßstab der Objektive

Die Vergrößerung bzw. der Abbildungsmaßstab (Maßstabszahl) eines Objektivs wird nicht völlig willkürlich gewählt. Es hat sich eingebürgert, nur solche Werte zu wählen, die einer Normreihe angehören. Als Normreihe wird die in Tafel 2.7 angegebene Zahlenreihe zugrunde gelegt, bei der die Abweichung einer Zahl von der nächstfolgenden 25% beträgt.

Tafel 2.6. Anpassungsmaße (in mm) einiger Hersteller

Hersteller	Abgleichlänge Objektiv	Abgleichlänge Okular	Tubus-weglänge	Objekt-Bildentfernung	Bemerkung (Verwendung, Objektivart)
VEB Carl Zeiss JENA (DDR)	45	13	160	192	Durchlichtmikroskope
			∞	∞	Auflicht- und Spezialmikr.
	75	13	∞	∞	Objektive mit großem Arbeitsabstand
LOMO (UdSSR)			160		
			190		
Meopta (ČSSR)			170		
Leitz (BRD)	45	18	170	197	Durchlichtmikroskope
			∞	∞	Auflichtmikroskope
	37	18	170	189	Durchlichtmikroskope (keine Planobjektive)
			185		Spezialobj. für Auflicht
			215		
Opton (BRD)	45	10	160	195	Durchlichtmikroskope
	33	10			Auflichtmikr., Spezialobj. für Universaldrehtisch
			∞		Spezialmikroskop
Reichert (Österreich)	37	13	160	184	
			190		Metallmikroskope
			250		Metallmikroskope MeF
Wild (Schweiz)			160		
Nachet (Frankreich)			160		
			215		Auflichtmikroskope
			∞		
Vickers (Großbritannien)			160		
Watson (Großbritannien)	45		160		
American Optical Co. (USA)			160 neuerdings: ∞		
Bausch & Lomb (USA)			160		Vertikal-
			215		Illuminator
			250		Metallmikroskope
Olympus (Japan)			160		

Der umrandete Bereich ist für die Vergrößerung von Objektiven V_{Obj} bzw. den Abbildungsmaßstab M_{Obj} vorgesehen. Werden für die Okularvergrößerung V_{Ok}, den Abbildungsmaßstab von Projektiven M_{Proj} sowie den Tubusfaktor q_∞ oder für entsprechende Faktoren von Zwischensystemen ebenfalls Zahlen aus der Normzahlenreihe gewählt, so ist die Gesamtvergrößerung des Mikroskops V_{Mikr} bzw. der gesamte Abbildungsmaßstab des Mikroskops M auch ein Zahlenwert der Normzahlenreihe, da Multiplikationen von Zahlen dieser Reihe entweder genau oder mit ausreichender Näherung wieder Zahlen der Normzahlenreihe ergeben.

Tafel 2.7. Normzahlenreihe

						0,4	0,5	0,63	0,8
1	1,25	1,6	2	2,5	3,2	4	5	6,3	8
10	12,5	16	20	25	32	40	50	63	80
100	125	160	200	250	320	400	500	630	800
1000	1250	1600							

Eine so dichte Abstufung, wie sie die Normzah-

Tafel 2.8. Vergrößerung bzw. Abbildungsmaßstab (Maßstabszahl) von Mikroskopobjektiven des VEB Carl Zeiss JENA entsprechend der Normreihe

Objektivreihen (Auswahl)	1	3,2	4	6,3	8	10	12,5	16	20	25	40	50	63	100
Achromate 160/0,17		3,2		(6,3)		10			20		40		(63)	100
Apochromate 160/0,17				6,3				16			40		(63)	100
Planachromate 160/0,17	(1)	3,2				10			20		40			100
Planapochromate 160/0,17			(4)			10				25			63	100
Planachromate ∞/0				6,3			12,5	(16)		25		50		100
Planapochromate ∞/0										25		50		100
Objektive mit großem Arbeitsabstand			4		8			16			40			
Planachromate ∞/0,17		3,2		6,3			12,5			25		50		100

lenreihe darstellt, ist für die Vergrößerung bzw. den Abbildungsmaßstab von Objektiven nicht erforderlich. Tafel 2.8 gibt eine Übersicht über die Vergrößerungen bzw. den Abbildungsmaßstab von einigen ausgewählten Objektivreihen. Über das tatsächliche Angebot geben die einschlägigen Prospekte genaue Auskunft.

In den Objektivreihen ist der höheren Objektivvergrößerung die größere numerische Apertur zugeordnet. Im einzelnen spielen die numerische Apertur, der Korrektionstyp, die gewünschte Lichtstärke des Objektivs und einige spezielle Gesichtspunkte für den jeweiligen Anwendungszweck eine Rolle bei der Wahl der Vergrößerung bzw. des Abbildungsmaßstabs.

2.5.1.3. Numerische Apertur – Trockenobjektive – Immersionsobjektive

Die Definition und die Bedeutung der numerischen Apertur $A = n \sin \sigma$ sind in den Abschnitten 2.3.2.1. und 3.2.4. nachzulesen. Es wird hier darauf hingewiesen, daß sie eine wichtige Kenngröße eines Mikroskopobjektivs ist, die zu dessen Kennzeichnung dient. Wenn das Auflösungsvermögen des Mikroskops im Vordergrund des Interesses steht, ist sie die wichtigste Kenngröße.

Trockenobjektive sind Mikroskopobjektive, bei denen sich zwischen dem unbedeckten bzw. bedeckten Präparat ein Luftraum befindet. Bei Trockensystemen ist die höchste technisch realisierbare numerische Apertur $A = 0{,}95$ und die theoretische Grenze $A = 1{,}0$. Objektive mit kleinen und mittleren Aperturen werden meist als Trockensysteme ausgeführt.

Bei größeren Aperturen wirken sich bereits sehr geringe Abweichungen von der vorgeschriebenen Deckglasdicke aufgrund des dadurch entstehenden Öffnungsfehlers ungünstig auf die Bildgüte aus (s. Abschn. 2.5.1.4.). Starke Trockensysteme für bedeckte Präparate werden deshalb mit einer Korrektionsfassung (s. Abschn. 2.5.1.5.) versehen, die ein Einstellen auf die verwendete Deckglasdicke gestattet und so den Öffnungsfehler kompensiert.

Bei Immersionsobjektiven befindet sich zwischen dem Präparat und der Frontlinse des Objektivs eine Flüssigkeit, die man als Immersionsflüssigkeit bezeichnet. Objektive, die in eine Flüssigkeit eintauchen, nennt man auch Immersionsobjektive. Die Immersionsflüssigkeit ist ein optisches Medium, das im Abbildungsstrahlengang liegt und in die Berechnung des Objektivs einbezogen ist. Abweichungen von den zugrunde gelegten optischen Daten, Blasen, Schlieren, Inhomogenitäten durch Verharzungen usw. wirken sich deshalb störend auf die Bildqualität aus und müssen vermieden werden. Abgesehen von diesen vermeid-

baren Störungen, haben Immersionsobjektive gegenüber Trockenobjektiven in mancher Hinsicht Vorteile. Immersionsobjektive werden hauptsächlich dann verwendet, wenn die numerische Apertur und damit das Auflösungsvermögen erhöht werden soll. Die Erhöhung der numerischen Apertur kommt durch die Brechzahl n der Immersionsflüssigkeit zustande, die als Faktor in $A = n \sin \sigma$ eingeht. Das bedeutet, daß sich ein Trockenobjektiv und ein Immersionsobjektiv, die Strahlen gleichen Öffnungswinkels aufnehmen, in der numerischen Apertur um den Faktor n unterscheiden. Bei Verwendung von Immersionsöl mit $n = 1{,}515$ sind den gebräuchlichen numerischen Aperturen von Immersionsobjektiven $A = 1{,}25$; 1,30; 1,35 und 1,40 die halben Öffnungswinkel $\sigma = 56°$, 59°, 63° und 68° zugeordnet, die bei einem Trockensystem zu $A = 0{,}83$; 0,86; 0,89 und 0,93 führen würden. Ein weiterer Vorteil von Immersionsobjektiven besteht darin, daß der Anteil an unerwünschtem Reflexlicht, der grundsätzlich bei jeder Brechung entsteht, an der Frontfläche der Frontlinse und bei bedeckten Präparaten am Deckglas vermindert oder ganz beseitigt wird. Aus diesem Grund ist es für bestimmte Zwecke vorteilhaft, besonders bei Auflichtuntersuchungen schwach remittierender Objekte, Immersionsobjektive auch von geringeren numerischen Aperturen zu verwenden.

Von einer homogenen Immersion (HI) spricht man, wenn bei einem Objektiv für unbedeckte Präparate die Brechzahlen der Immersionsflüssigkeit und der Frontlinse übereinstimmen. Bei einem Objektiv für bedeckte Präparate ist im Fall der HI zusätzlich zu fordern, daß die Brechzahlen des Deckglases und des Einbettungsmittels gleich den Brechzahlen von Immersionsflüssigkeit und Frontlinse sind oder annähernd mit ihnen übereinstimmen. Darüber hinaus sollten die Dispersionen der Medien, besonders die Dispersion der Immersionsflüssigkeit, nur innerhalb enger Grenzen schwanken, damit kein störender wellenlängenabhängiger Öffnungsfehler entsteht.

Das Prinzip der homogenen Immersion ist von *I. W. Stephenson* angegeben und von *Abbe* eingeführt worden. Es hat den großen Vorteil, daß als erste brechende Fläche die aplanatische Fläche der Frontlinse wirkt, die ohne Öffnungsfehler abbildet und dabei gleichzeitig die Sinusbedingung erfüllt (Bild 2.29). Bei strenger Verwirklichung des Prinzips der homogenen Immersion ist es gleichgültig, ob ein Deckglas verwendet wird oder nicht – vorausgesetzt, daß es der Objektabstand zuläßt. Die technischen Ausführungen der mit HI gekennzeichneten Immersionsobjektive erlauben jedoch keine strenge Verwirklichung dieses Prinzips, da die Brechzahlen und die ν-Werte von Deckglas, Immersionsflüssigkeit und Frontlinse nicht genau übereinstimmen. Es ist üblich, durch die Gravierung auf den Immersionsobjektiven anzugeben, ob sie mit oder ohne Deckglas berechnet worden sind. Das ist notwendig, weil Immersionsobjektive für unbedeckte Präparate meist einen so kleinen Objektabstand haben, daß er zum Zwischenschalten eines Deckglases nicht ausreicht. Reicht der Objektabstand aus, so sind Immersionsobjektive gegen Schwankungen von Deckglasdicken weitgehend unempfindlich.

Homogene Immersionen sind meist Ölimmersionen, entweder mit Zedernholzöl ($n_d = 1{,}5153$, $\nu_d = 49{,}2$) oder mit synthetischem Immersionsöl ($n_d = 1{,}515$, $\nu_d = 50$) als Immersionsflüssigkeit. Die Kennzeichnung der Objektive mit HI oder als Ölimmersion ist deshalb als gleichbedeutend aufzufassen. Da die Immersionsöle verschiedener Hersteller bezüglich der maßgeblichen optischen Daten voneinander abweichen können, empfiehlt es sich, das Immersionsöl von dem Hersteller der jeweils benutzten Mikroskopobjektive zu beziehen. Über die Handhabung von Ölimmersionsobjektiven im praktischen Gebrauch wird auf Abschn. 6.1.1.4. verwiesen.

In der UV-Mikroskopie sind Ölimmersionen ungeeignet. Sie absorbieren das ultraviolette Licht. Man verwendet häufig eine Glyzerin-Wasser-Mischung ($n_D \approx 1{,}453$ bei etwa 10% Wassergehalt) als Immersionsflüssigkeit. Damit kann für einen kleinen Spektralbereich das Prinzip der homogenen Immersion verwirklicht werden, wenn die Frontlinse aus Quarzglas besteht, wie es bei UV-Objektiven hoher numerischer Apertur üblich ist. Bei der Kennzeichnung der Objektive wird auf die Glyzerinimmersion verwiesen (z. B. durch die Abkürzung Glyc. oder Glyz. I.). Reines Glyzerin ist stark hygroskopisch. Auch bei einer Glyzerin-Wasser-Mischung, besonders bei geringem Wasseranteil, kann sich eine Änderung der Brechzahl durch Wasseraufnahme ergeben. Die Reinigung von Glyzerinimmersionen erfolgt mit Wasser.

In der Mikroskopie wird sowohl im sichtbaren als auch im ultravioletten Spektralbereich Wasser ($n_d = 1{,}33305$, $\nu_d = 55{,}6$) als Immersionsflüssigkeit verwendet. Objektive für Wasserimmersion (Abkürzung WI) können entweder für Präparate mit Deckglas oder ohne Deckglas ausgeführt werden. Bei Wasserimmersionen für bedeckte Präpa-

rate sollte man destilliertes Wasser verwenden, um erstens Kalkrückstände auf dem Deckglas zu vermeiden und zweitens bei Arbeiten im UV-Bereich die Durchlässigkeit von H_2O nicht durch Verunreinigungen zu beeinträchtigen.
In der UV-Mikroskopie ist als Immersionsflüssigkeit noch n-Hexadekan verwendet worden [33]. In der Infrarotmikroskopie, die sich mit Wellenlängen über 3 μm beschäftigt, ist die Wahl von Immersionsflüssigkeiten sehr begrenzt, weil die meisten Flüssigkeiten in diesem Bereich Absorptionsbanden zeigen. Flüssiges Paraffin kann verwendet werden.
Die Möglichkeit, durch die Brechzahl der Immersionsflüssigkeit die numerische Apertur und damit das Auflösungsvermögen zu steigern, veranlaßte *Abbe* dazu, die Monobromnaphthalin-Immersion ($n_d = 1{,}66$, $\nu_d = 20{,}3$) einzuführen, mit der numerische Aperturen bis $A = 1{,}60$ erreicht wurden. Aufgrund der Invarianzeigenschaft von $A = n \sin \sigma$ im Objektraum (s. Abschn. 2.3.2.1.) tritt die gleiche numerische Apertur innerhalb des Deckglases und im Bereich des Objekts bzw. des Einbettungsmittels auf. Um die numerische Apertur wirksam werden zu lassen, müßten deshalb Deckgläser mit höherer Brechzahl als üblich und auch Einbettungsmittel von annähernd $n = 1{,}6$ verwendet werden. Monobromnaphthalin scheidet als Einbettungsmittel aus, weil es organische Substanzen angreift. Aufgrund dieser Schwierigkeiten hat man Monobromnaphthalin-Immersionen nur für unbedeckte Objekte verwendet, besonders zur Auflichtuntersuchung von Metallanschliffen.

2.5.1.4. Objektive mit und ohne Deckglas – Einfluß abweichender Deckglasdicke

Mikroskopobjektive kann man danach einteilen, ob sie für unbedeckte Objekte (Deckglasdicke = 0), für Deckgläser mit der normalen Deckglasdicke 0,17 mm oder für Deckgläser bzw. Planparallelplatten mit größerer Dicke korrigiert sind. Ob unbedeckte oder bedeckte Objekte verwendet werden, hängt von der Art des Objekts und vom mikroskopischen Verfahren ab. In der Regel wird im Auflicht mit unbedeckten und im Durchlicht mit bedeckten Präparaten gearbeitet. Das Zeichen „–“ auf der Gravur bedeutet, daß das Objektiv gegen Schwankungen der Deckglasdicke in einem Bereich von 0 bis etwa 0,2 mm unempfindlich ist, d.h., daß es sowohl für unbedeckte als auch für bedeckte Objekte benutzt werden kann, ohne daß die Bildgüte beeinträchtigt wird. Es kann jedoch vorkommen, daß ein als deckglasunempfindlich gekennzeichnetes Objektiv nicht mehr streng mit anderen Objektiven abgeglichen ist. Das tritt z.B. dann auf, wenn das deckglasunempfindliche Objektiv für Untersuchungen von bedeckten Präparaten innerhalb einer Objektivreihe verwendet wird, die für Deckglas korrigiert und dementsprechend abgeglichen ist, während es selbst ohne Deckglas abgeglichen ist. Auch der umgekehrte Fall kann auftreten. Im ersten Fall vergrößert sich die Objektentfernung bei dem deckglasunempfindlichen Objektiv gegenüber den anderen Objektiven der Reihe um etwa 0,06 mm, im anderen Fall verringert sich die Objektentfernung um die gleiche Strecke. Durch Nachfokussieren kann man wieder optimal einstellen.
Nur für Objektive von kleiner numerischer Apertur bis etwa $A = 0{,}3$ ist es für die Bildgüte gleichgültig, ob das Objektiv mit oder ohne Deckglas verwendet wird. Bei größeren numerischen Aperturen ist die Vorschrift, ob das Objektiv mit oder ohne Deckglas zu verwenden ist, unbedingt einzuhalten. Darüber hinaus wächst der Einfluß abweichender Deckglasdicke auf die Bildgüte mit zunehmender numerischer Apertur rasch an. Bei einem starken Trockensystem mit $A = 0{,}9$ wirkt sich bereits eine Dickenabweichung von 0,01 mm störend auf die Bildgüte aus. Immersionsobjektive sind auch bei höheren numerischen Aperturen wenig empfindlich gegen Abweichungen von der normalen Deckglasdicke. Bei strenger Verwirklichung des Prinzips der homogenen Immersion (s. Abschn. 2.5.1.3.) ist es sogar gleichgültig, ob ein Deckglas verwendet wird oder nicht.
Die Wirkungsweise eines Deckglases oder einer rechtwinklig zur optischen Achse im Objektraum angeordneten Planparallelplatte eines Trockenobjektivs (z. B. die abschraubbare Frontplatte des Spiegelobjektivs 40 × /0,50; s. Abschn. 2.5.3.) soll im folgenden näher untersucht werden. Das Deckglas von der Dicke 0,17 mm oder die Planparallelplatte von vorgeschriebener Dicke sind für die dafür korrigierten Objektive als Bestandteil des abbildenden optischen Systems zu betrachten. Die von einem Objektpunkt ausgehenden Strahlen verlassen das Deckglas oder die Planparallelplatte mit einem überkorrigierten Öffnungsfehler und einer chromatischen Überkorrektion. Für beide Fehler ist es ohne Belang, an welcher Stelle im Objektraum die Planparallelplatte angeordnet ist. Das Deckglas liegt unmittelbar auf dem Präparat auf, so daß bei der Korrektion der Objektive die Annahme gemacht wird, daß der Objektpunkt an der Unterseite des Deckglases liegt.

Der durch Deckglas oder Planparallelplatte erzeugte Öffnungsfehler kann als Längsaberration durch die Gleichung

$$\Delta s' = d\left(\frac{1}{n} - \sqrt{\frac{1 - A^2}{n^2 - A^2}}\right) \qquad (2.88)$$

dargestellt werden, worin d die Deckglasdicke bzw. die Dicke der Planparallelplatte, n deren Brechzahl und A die numerische Apertur ist. Für kleine Aperturen erhält man daraus die Näherungsgleichung

$$\Delta s' = \frac{n^2 - 1}{2n^3}\, dA^2 . \qquad (2.88\,a)$$

Dieser Öffnungsfehler wird in die Gesamtkorrektion des Objektivs einbezogen und somit kompensiert. Weicht jedoch die Dicke d von der vorgeschriebenen ab, so wird die Längsaberration entweder kleiner oder größer und führt zu einem Öffnungsfehler des Gesamtsystems. Zu dünnes Deckglas ergibt sphärische Unterkorrektion, zu dickes Deckglas sphärische Überkorrektion. Der entstehende Öffnungsfehler stört nicht, wenn er innerhalb einer zulässigen Toleranz liegt.

Nimmt man an, daß das Objektiv für ein Deckglas von 0,17 mm Dicke oder für eine Planparallelplatte bestimmter Dicke optimal korrigiert ist und völlig ohne Öffnungsfehler abbildet – die Definitionshelligkeit η wäre dann 100% –, so könnte man für die durch die Dickenabweichung Δd bedingte sphärische Unter- oder Überkorrektion das Vierfache der Einstelltoleranz nach Gl. (2.60b) zulassen, womit sich die Definitionshelligkeit $\eta = 80\%$ ergäbe. Da man jedoch annehmen muß, daß das Objektiv bereits mit Restfehlern behaftet ist, ist es angebracht, nur das Doppelte der Einstelltoleranz t' zuzulassen. Man erhält dann für die zulässige Dickenabweichung des Deckglases oder der Planparallelplatte, ausgehend von der Näherungsgleichung (2.88a), die Gleichung

$$\Delta d \leqq \frac{4n^3}{n^2 - 1}\,\frac{\lambda}{A^4}, \qquad (2.89\,a)$$

die ebenfalls nur für kleine Aperturen gültig ist und die nach Einsetzen der Brechzahl für $\lambda = 550$ nm in der leicht merkbaren Form

$$d \leqq \frac{0{,}006}{A^4} \quad \text{in mm} \qquad (2.89\,b)$$

geschrieben werden kann. Für größere Aperturen wird die Gleichung komplizierter, weil man dann von Gl. (2.88) ausgehen muß.

Aus der grafischen Darstellung (Bild 2.42) kann man entnehmen, welche Dickenabweichung des Deckglases oder der Planparallelplatte für eine gegebene numerische Apertur eines Trockenobjektivs aufgrund des entstehenden Öffnungsfehlers noch zulässig ist. Die erlaubte Dickentoleranz nimmt mit zunehmender Apertur rapid ab.

Bei starken Trockenobjektiven ist die zulässige Abweichung der Deckglasdicke sehr gering, sie liegt bei 0,01 mm und darunter. Hierbei ist zu beachten, daß in der Praxis die betrachtete Objekteinzelheit zwischen Deckglasunterseite und Objektträger liegen kann (s. Bild 2.14). Stimmt die Brechzahl des Einbettungsmittels annähernd mit der Brechzahl des Deckglases überein, so wirkt das zwischen Objekt und Deckglasunterseite befindliche Einbettungsmittel so, als wäre das Deckglas um diesen Betrag dicker. Bei Trockenobjektiven hoher numerischer Apertur sollte man die Deckgläser nach der erforderlichen Dicke auswählen (z.B. durch Messen mit einer Feinmeßschraube). Für Deckglas korrigierte Trockenobjektive höchster numerischer Apertur werden mit Korrektionsfassung geliefert (s. Abschn. 2.5.1.5.), die eine optimale Einstellung auf die vorhandene effektive Deckglasdicke ermöglicht.

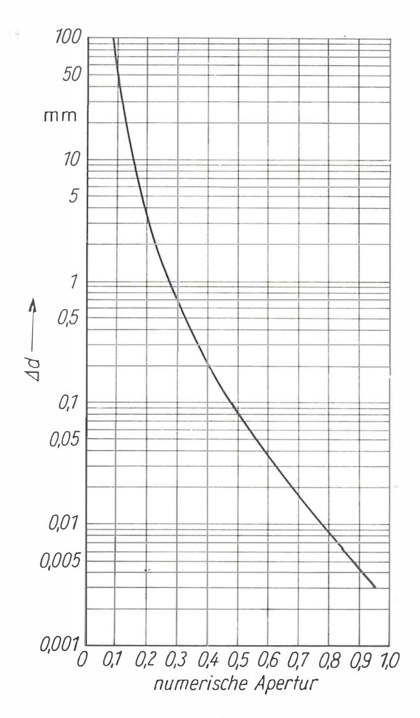


Bild 2.42. Zulässige Dickenabweichung eines Deckglases in Abhängigkeit von der numerischen Apertur eines Mikroskopobjektivs (Trockenobjektiv) aufgrund des entstehenden Öffnungsfehlers

Bei Objektiven sehr kleiner Apertur sind erhebliche Dickenabweichungen zulässig, die ein Vielfaches der Deckglasdicke betragen können, so daß im Objektraum z.B. eine Planparallelplatte größerer Dicke angeordnet werden kann, ohne daß die Bildgüte aufgrund des Öffnungsfehlers beeinträchtigt wird. Es ist jedoch zu beachten, daß durch eine Planparallelplatte neben dem Öffnungsfehler noch eine chromatische Überkorrektion erzeugt wird, die bei kleinen Aperturen für die zulässige Dicke maßgeblich wird.
Die durch ein Deckglas oder eine Planparallelplatte erzeugte chromatische Überkorrektion beträgt

$$\Delta s'_\lambda = s'_{F'} - s'_{C'} = \frac{n_{F'} - n_{C'}}{n_{F'} n_{C'}} d \approx \frac{n-1}{n^2} \frac{1}{\nu} d, \tag{2.90a}$$

worin n eine mittlere Brechzahl (n_e für $\lambda = 546$ nm) und $\nu = (n_e - 1)/(n_{F'} - n_{C'})$ die Abbesche Zahl ist. Zahlenmäßig ergibt sich

$$\Delta s'_\lambda \approx 0{,}004\, d. \tag{2.90b}$$

Auch dieser Fehler ist bei deckglaskorrigierten Objektiven in die Gesamtkorrektion einbezogen. Änderungen der Dicke d führen zur Änderung des chromatischen Korrektionszustands. Wenn man auf die wellenoptische Einstelltoleranz t' Bezug nimmt und für die entstehende chromatische Längsaberration das k-fache von t' zuläßt, erhält man aus Gl. (2.90b)

$$\Delta d \leqq 0{,}14\, k \frac{1}{A^2} \quad \text{in mm.} \tag{2.91}$$

Die Wahl von k hängt davon ab, ob ein achromatischer oder apochromatischer Korrektionszustand vorliegt. Mit $k = 0{,}5$ ergibt sich, daß die zulässige Dickenabweichung Δd für numerische Aperturen unterhalb von $A = 0{,}3$ kleiner wird als diejenige, die aufgrund des Öffnungsfehlers nach Gl. (2.89b) berechnet wurde.
Aus der grafischen Darstellung (Bild 2.42) erhält man eine zulässige Dickenabweichung von 0,17 mm etwa für die numerische Apertur $A = 0{,}4$. Hiernach könnten Objektive dieser Apertur noch als deckglasunempfindlich bezeichnet werden. Doch ist es üblich, bei der Festlegung der numerischen Apertur für deckglasunempfindliche Objektive einen strengeren Maßstab anzulegen, um mit Sicherheit zu gewährleisten, daß keine Beeinträchtigung der Bildgüte erfolgt. Hin und wieder wird auch in Betracht gezogen, daß eine Störung der Abgleichung vermieden werden soll. Im allgemeinen graviert man Objektive als deckglasunempfindlich für $A < 0{,}3$ und schreibt für $A \geqq 0{,}3$ vor, ob ein Deckglas 0,17 mm zu verwenden ist (Gravierung: 0,17) oder nicht (Gravierung: 0).

2.5.1.5. Objektivfassung – Präparateschutz – Korrektionsfassung

Die Objektivfassung ist der mechanische Teil des Mikroskopobjektivs, der die optischen Bauelemente zusammenhält. Die Fassung muß so konstruiert sein, daß die hohen Anforderungen an die Zentrierung und an die Einhaltung der Abstände zwischen den optischen Bauelementen gewährleistet sind. Eine übliche Fassung wird im Bild 2.43 gezeigt, bei der die Linsen bzw. die verkitteten Linsenglieder in einzelnen Fassungen zentriert und gehalten werden. Die Einzelfassungen werden in ein Fassungsrohr gefüllt und durch ein Vorschraubrohr gehalten (Füllfassung). Je nach Systemtyp ist während des Montagevorgangs eine Änderung eines ausgewählten Abstands zwischen zwei gefaßten Linsengliedern erforderlich, um die Einflüsse der Fertigungstoleranzen der Linsendicken zu kompensieren.
Objektivfassungen mit Präparateschutz (Bild 2.44) sind bei der Benutzung solcher Objektive von Vorteil, bei denen der freie Objektabstand klein ist. Stößt man beim Fokussieren versehentlich auf das Präparat auf, so weicht der Fassungsteil, der das optische System aufnimmt, gegenüber einem äußeren starren Fassungsrohr zurück. Dadurch wird weder das Präparat noch die Frontlinse des Objektivs beschädigt. Das Zurückweichen ist natürlich nur um eine geringe Strecke bis zu einem oberen Anschlag möglich. Durch eine Feder wird der bewegliche Fassungsteil mit dem optischen System in der Arbeitsstellung des Objektivs gegen einen unteren Anschlag gedrückt, so daß die Abgleichung mit anderen Objektiven einer Reihe gewährleistet ist (Federfassung).
Trockenobjektive von hoher numerischer Apertur, die für die Beobachtung bedeckter Präparate geeignet sind, werden in einer Korrektionsfassung (Bild 2.45) ausgeführt, um optimale Bildgüte auch bei abweichender effektiver Deckglasdicke zu ermöglichen (s. Abschn. 2.5.1.4.). Die entstehende sphärische Unter- oder Überkorrektion bei zu kleiner oder zu großer effektiver Deckglasdicke wird durch Änderung des Abstands zwischen dem vorderen und dem hinteren Teil des optischen Systems des Objektivs kompensiert, die mechanisch durch Drehung des Korrektionsrings bewirkt wird. In dem dargestellten Beispiel ist die

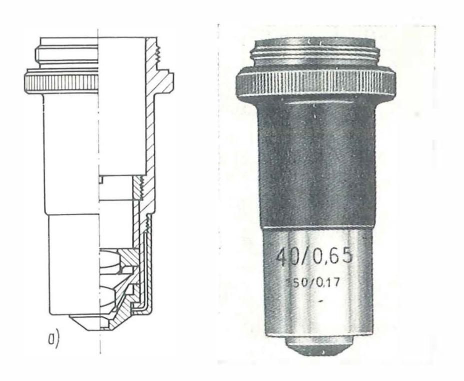


Bild 2.43. Fassung eines Mikroskopobjektivs
(Achromat 40/0,65 160/0,17)
a) Schnittzeichnung;
b) Fotografie des Objektivs

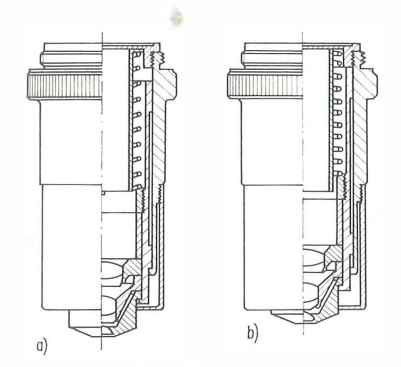


Bild 2.44. Mikroskopobjektiv mit Präparateschutz
a) in Arbeitsstellung;
b) beweglicher Fassungsteil, durch Zusammendrücken der Feder zurückgeschoben

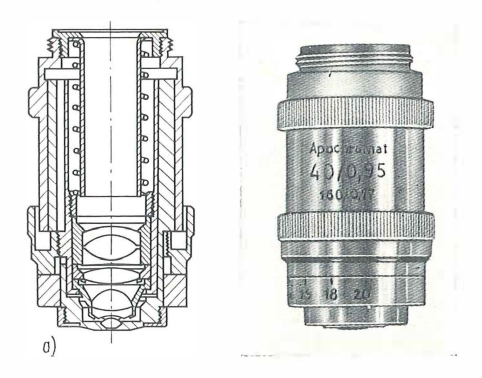


Bild 2.45. Korrektionsfassung eines Mikroskopobjektivs
(Apochromat 40/0,95 160/0,17), kombiniert mit Präparateschutz
a) Schnittzeichnung;
b) Fotografie des Objektivs

Korrektionsfassung mit einer Fassung für Präparateschutz kombiniert.
Die Skale der Korrektionsfassung ist mit den Zahlen (12... 17... 20) versehen, die der Deckglasdicke in hundertstel Millimeter entsprechen. Man erhält optimale Bildgüte, wenn die effektive Deckglasdicke, d.h. die Deckglasdicke vermehrt um die angenäherte Schichtdicke zwischen Objektdetail und Deckglasunterseite, auf die Strichmarke eingestellt wird.
Um den Korrektionsring richtig einstellen zu können, empfiehlt es sich, die Deckglasdicke vor der Präparation zu messen.
Soll ein fertiges Präparat untersucht werden, dessen Deckglasdicke nicht bekannt ist, kann man durch Ausmessen der gesamten Dicke des Präparats (bestehend aus Objektträger, Präparat mit Einschlußmittel und Deckglas) und der Dicke des Objektträgers und anschließende Differenzbildung dieser Meßwerte auf die effektive Deckglasdicke schließen. Will man diese Messungen vermeiden, kann man den Korrektionsring dadurch richtig einstellen, daß man ihn sukzessiv in verschiedene Stellungen bringt, fokussiert und durch Beobachten einer feinen, dunklen Objekteinzelheit die Stellung sucht, bei der das Objektdetail im maximalen Kontrast erscheint. Weitere Möglichkeiten für die richtige Einstellung des Korrektionsringes beruhen auf der sinngemäßen Anwendung der bei der Objektivprüfung angewendeten Verfahren: a) Beobachten eines möglichst dunklen, kleinen Partikelchens in der Bildmitte bei schiefer Beleuchtung. Der Korrektionsring ist richtig eingestellt, wenn gegenüberliegende Konturen keine einseitigen Säume zeigen, sondern scharf erscheinen. b) Beobachtung der Beugungsfigur einer als Sterntest wirkenden Punktlichtquelle (z.B. kolloidale Teilchen) bei Dunkelfeldbeleuchtung. Der Korrektionsring ist richtig eingestellt, wenn die Beugungsbilder bei Defokussierungen unterhalb und oberhalb der schärfsten Stellung annähernd gleiches Aussehen haben.

2.5.1.6.
Einteilung und Kennzeichnung der Objektive

Wie aus den Abschnitten 2.5.1.1. bis 2.5.1.5. hervorgeht, kann eine Einteilung der Mikroskopobjektive aufgrund verschiedener Merkmale erfolgen:
Vergrößerung bzw. Maßstabszahl
numerische Apertur
Objektive mit endlicher Bildweite (Tubus 160)
Objektive mit unendlicher Bildweite (Tubus ∞)
Objektive ohne Deckglas

Objektive mit Deckglas
deckglasunempfindliche Objektive
Trockenobjektive
Immersionsobjektive.

Das wesentlichste Einteilungsmerkmal eines Mikroskopobjektivs ist jedoch sein Korrektionszustand. Nach dem chromatischen Korrektionszustand unterscheidet man die folgenden Korrektionstypen

im sichtbaren Bereich:

Achromate
Halbapochromate oder Semiapochromate
(sog. Fluoritsysteme)
Apochromate;

im ultravioletten und sichtbaren Bereich:

(UV)-Monochromate
UV-VIS-Achromate
UV-VIS-Apochromate
vollständig farbfreie Objektive (reine Spiegelsysteme).

Wird zusätzlich Bildfeldebnung erreicht, so spricht man von Planobjektiven. Es sind gebräuchlich:

Planachromate
Planapochromate

Neuerdings ist es üblich geworden, die Planobjektivenach dem Grad der Bildfeldebnung in Normalfeld- und Großfeldobjektive zu unterscheiden.
Ein Objektiv ist durch den Korrektionstyp und die Angabe der wesentlichen Merkmale sowie der Herkunft und der Fabrikationsnummer gekennzeichnet. Zur Kennzeichnung dient außer der äußeren Gestaltung der Fassung (Tafel 2.9) vor allem die Beschriftung, die aufgraviert wird (Tafel 2.10).
Außer der Kenntlichmachung des Korrektionstyps ist mindestens die Maßstabszahl oder die Vergrößerung, die numerische Apertur, die Tubuslänge und eine Angabe über das Deckglas oder ein entsprechendes optisches Bauelement im Objektraum aufgraviert.

Planachromat
HI 100 / 1,25
160/ 0,17

Bild 2.46. Beispiel einer Gravierung für ein Mikroskopobjektiv

Das Beispiel einer Gravierung wird im Bild 2.46 gezeigt. Es handelt sich um einen Planachromaten mit homogener Immersion (Ölimmersion) der Maßstabszahl 100 und der numerischen Apertur 1,25 (beide Angaben durch Schrägstrich getrennt), für Tubuslänge 160 mm und Deckglas 0,17 mm (beide Angaben durch Schrägstrich getrennt). Das Objektiv hat eine Irisblende.

2.5.2. Objektive für einen breiten Anwendungsbereich

Mikroskope allgemeiner Art für Durchlicht und Auflicht werden je nach Anwendungszweck und Preisniveau mit Objektivreihen ausgerüstet, die aus Achromaten, Fluoritobjektiven, Apochromaten, Planachromaten oder Planapochromaten bestehen. Die verschiedenen Objektivtypen unterscheiden sich z.T. erheblich in ihrem optischen Aufbau. Am Beispiel mittelstarker Trockensysteme der numerischen Apertur 0,65 wird der unterschiedliche Aufwand für einen Achromaten, Apochromaten, Planachromaten und Planapochromaten durch die schematisch dargestellten Bauformen im Bild 2.47 demonstriert.

Achromate

Achromate sind Objektive, die im Vergleich zu den anderen Objektivtypen den einfachsten optischen Aufbau haben. Die günstigste Korrektion liegt im gelben und grünen Bereich des Spektrums, den das menschliche Auge am hellsten wahr-

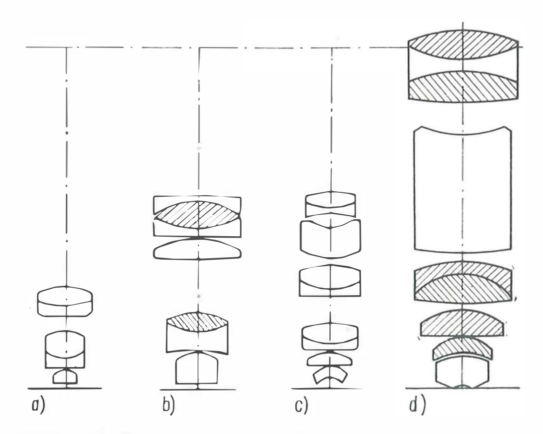


Bild 2.47. Bauformen von Mikroskopobjektiven mit der numerischen Apertur 0,65

a) Achromat 40/0,65 160/0,17;
b) Apochromat 20/0,65 160/0,17;
c) Planachromat 40/0,65 160/0,17;
d) Planapochromat 25 × /0,65 ∞/0
Die schraffierten Linsen bestehen aus Flußspat oder Sondergläsern

Tafel 2.9. Gestaltung der Objektivfassung

Korrektionstyp	Oberer Fassungsteil	Unterer Fassungsteil (Gravierhülse)	Schrift	Aufgravierte Typenbezeichnung
Achromate	schwarz	strichpoliert verchromt	schwarz	–
Apochromate	hochglanz verchromt	hochglanz verchromt	weiß	Apochromat
Planachromate	schwarz	strichpoliert verchromt	schwarz	Planachromat
Planapochromate	hochglanz verchromt	hochglanz verchromt	weiß	Planapochromat
Spiegelobjektive[1]) (katoptrisch, katadioptrisch)	verchromt	strichpoliert verchromt	schwarz	Spiegelobjektiv

[1]) Ausnahme: Spiegelobjektiv 40×/0,50

Tafel 2.10. Gravierungen auf der Objektivfassung

Kurzzeichen	Bedeutung
HI, zusätzlich: schwarzer Ring	Homogene Immersion, gleichbedeutend mit Ölimmersion
WI, zusätzlich: weißer Ring	Wasserimmersion
Glyz I, zusätzlich: roter Ring	Glyzerinimmersion (mit geringem Wasseranteil und vorgeschriebenem n_d-Wert)
Zum Beispiel 40	Maßstabszahl (Abbildungsmaßstab)
Zum Beispiel 40×	Vergrößerung
Zum Beispiel 0,65	numerische Apertur
160	Tubuslänge 160
∞	Tubuslänge ∞
0,17	Das Objektiv ist mit Deckglas 0,17 mm zu verwenden
0	Das Objektiv ist ohne Deckglas zu verwenden
–	Das Objektiv kann mit oder ohne Deckglas verwendet werden
2	Das Objektiv ist mit Deckglas bzw. Planparallelplatte von 2 mm Dicke zu verwenden
S	Das Objektiv ist für Segment vorgesehen
<	Zeichen für Irisblende, Pfeilspitze in Schließrichtung, bei geschlossener Iris, num. Apertur 0,8
Pol (in roter Schrift)	Objektiv für Polarisationsmikroskopie
Ph (in roter Schrift)	Objektiv für Phasenkontrast, mit einem Phasenring
Phv (in roter Schrift)	Objektiv für veränderlichen Phasenkontrast, mit einem breiten und einem schmalen Phasenring
K	Objektiv für Kammerpräparate, Objektiv mit besonders großem Arbeitsabstand
L (in roter Schrift)	Objektiv für Laser-Mikrospektralanalyse
GF	Großfeld-Planobjektiv, korrigiert für Zwischenbildgröße $(2y') \geqq 28$ mm
A	Objektiv ohne chromatische Vergrößerungsdifferenz, erfordert Okulare ohne chromatische Kompensationswirkung
C	Objektiv mit chromatischer Vergrößerungsdifferenz, erfordert Okulare mit chromatischer Kompensationswirkung

nimmt. Die Bildorte für die blauen und roten Strahlen, die das Auge schwächer wahrnimmt, liegen weiter vom Objektiv entfernt (s. Kurve *1* im Bild 2.39). Hinzu kommt meist ein geringfügig überkorrigierter Öffnungsfehler für die F'-Linie (Blau) und ein entsprechend unterkorrigierter Öffnungsfehler für die C'-Linie (Rot), d.h. eine chromatische Variation des Öffnungsfehlers. Die chromatischen Fehler der Achromate fallen beim visuellen Gebrauch der Objektive kaum auf. Bei schiefer Beleuchtung ergeben sich an dunklen Präparatstellen violette und gelbgrüne Farbsäume. Ähnliche Farberscheinungen treten bei gerader Beleuchtung auf, wenn man geringfügig defokussiert.

Die schwächeren und mittelstarken Achromate haben keine chromatische Vergrößerungsdifferenz. Sie sind deshalb mit Okularen ohne Kompensationswirkung zu verwenden (A-Okulare). Aufgrund einer chromatischen Vergrößerungsdifferenz des achromatischen Immersionsobjektivs HI 100/1,25 sind für dieses Objektiv Okulare mit Kompensationswirkung (AK-Okulare) geeignet. Die Bildfeldkrümmung ist bei Achromaten nicht beseitigt, obwohl sie bei Verwendung neuerer Gläser und geeignetem Systemaufbau besser als bei älteren Typen ist. Achromate werden nur für Tubuslänge 160 mm hergestellt.

Fluoritobjektive

Als Fluoritobjektive werden solche Objektive bezeichnet, die hinsichtlich der Farbkorrektion eine Mittelstellung zwischen den Achromaten und den Apochromaten einnehmen. Ihr Aufbau ist ähnlich einfach wie der der Achromate. Durch Verwendung von Flußspatlinsen ist das sekundäre Spektrum vermindert (Halbapochromate).

Fluoritobjektive waren im Fertigungsprogramm des VEB Carl Zeiss JENA. Heute werden sie in Jena nicht mehr gefertigt, da mit den Reihen der Achromate und Apochromate sowie der entsprechenden Planobjektive Mikroskopobjektive zur Verfügung stehen, die den verschiedensten Forderungen gerecht werden. Von einigen anderen Herstellern werden Fluoritobjektive angeboten, wobei die Bezeichnung Fluorit oder abgewandelte Bezeichnungen (z.B. Neofluare) angewendet werden. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, daß Flußspat in beschränktem Umfang auch in Planachromaten Verwendung findet, wenn es zur Verminderung des sekundären Spektrums angemessen erscheint, ohne daß ausdrücklich auf den Fluoritcharakter solcher Objektive hingewiesen wird.

Apochromate

Bei Apochromaten wird mit Hilfe von Glasarten mit speziellem Dispersionsverlauf und vor allem durch Flußspat erreicht, daß das sekundäre Spektrum beseitigt oder weitestgehend vermindert wird und ein solcher Farbverlauf entsteht (s. Kurve *3* im Bild 2.39), daß die Bildorte für drei Farben übereinstimmen. Zwischen diesen Farben sind die Abweichungen sehr gering (tertiäres Spektrum), so daß die Bilder aller Farben des sichtbaren Spektrums praktisch an einem Ort entstehen. Man spricht auch dann noch von apochromatischer Korrektion, wenn das sekundäre Spektrum so weitgehend vermindert ist, daß dadurch ebenfalls die Bildorte für alle Farben des sichtbaren Spektrums nahezu übereinstimmen. Außerdem ändert sich bei apochromatischer Korrektion der Öffnungsfehler nur sehr wenig mit der Wellenlänge. Aufgrund dieser Eigenschaften sind Apochromate besonders geeignet, wenn feinste Farben- und Struktureinzelheiten zu beobachten sind. Im Vergleich zu Achromaten werden die Apochromate bei gleicher Maßstabszahl (oder Brennweite) wegen ihrer besseren Korrektion mit größerer numerischer Apertur ausgeführt. Es können deshalb auch stärkere Okulare mit Vorteil benutzt werden. Durch die chromatische Vergrößerungsdifferenz der Apochromate sind Kompensationsokulare erforderlich.

Die Bildfeldkrümmung ist wie bei Achromaten nicht behoben. Apochromate werden nur für Tubusweglänge 160 mm hergestellt.

Die Entwicklung und Herstellung der Apochromate ist *E. Abbe* zu verdanken, der diese – abgesehen vom Feldrand – ausgezeichnet korrigierten Systeme erstmals im Jahre 1886 in einem Vortrag vor der „Jenaischen Gesellschaft für Medizin und Naturwissenschaft" bekannt gab [11]. Der produktionsreifen Einführung apochromatischer Objektive gingen Jahre zielgerichteter intensiver Forschungsarbeit voraus, wobei der Zusammenarbeit mit *Otto Schott*, der neue Gläser mit speziellen gewünschten Eigenschaften herstellte, besondere Bedeutung zukam.

Planachromate

Planachromate sind achromatisch korrigierte Objektive mit geebnetem Bildfeld. Ihr Farbverlauf entspricht im Prinzip dem der Achromate (s. Kurve *1* im Bild 2.39). Durch geeignete Glasarten und in beschränktem Umfang auch durch Flußspat wird das sekundäre Spektrum klein gehalten. Die praktisch vollkommene Beseitigung

der Bildfeldwölbung bei gleichzeitig behobenem Zweischalenfehler gelang *Boegehold* [14], [15] [16] durch Verwendung „dicker Menisken" (s. Abschnitt 2.4.3.4.). Dadurch wurde der Aufbau der Planachromate erheblich komplizierter als bei den Achromaten. Besonders hoch ist der Aufwand bei Immersionsobjektiven mit ebenem Bildfeld, weil die auf die Bildfeldebnung günstig wirkende Hohlfläche des Frontmeniskus, die bei Trockenobjektiven üblich ist, an Wirkung verliert, wenn sie an Immersionsflüssigkeit grenzt. Eine stark gekrümmte Hohlfläche als Frontfläche scheidet aus praktischen Gründen aus, weil durch die Höhlung die Reinigung der Frontlinse sehr erschwert wird. Deshalb wird in einen Frontmeniskus von hoher Brechzahl eine kleine Linse niedriger Brechzahl, die etwa mit der Brechzahl des Immersionsmittels übereinstimmt, von meist plankonvexer Gestalt eingekittet oder eingeschmolzen, wodurch ein Bildebnungseffekt entsteht und die Reinigung des Objektivs bequem möglich ist. Eine andere Möglichkeit ergibt sich durch Verwendung mehrerer Menisken auf der Bildseite der Objektive.

Planachromate haben i. allg. eine chromatische Vergrößerungsdifferenz, die mit Kompensationsokularen ausgeglichen wird. Das geebnete Bildfeld erlaubt die Anwendung von Okularen mit größerem Sehfeld. Es werden PK-Okulare (Plan-Kompensationsokulare) verwendet.

Durch das geebnete Bild in Verbindung mit dem größeren Sehfeld der PK-Okulare kann bei einer Einstellung ein wesentlich größeres Objektfeld als bei Achromaten gleichzeitig scharf gesehen werden. Dieser bereits bei der visuellen Beobachtung wichtige Informationsgewinn wird zu einem entscheidenden Fortschritt in der Mikrofotografie.

Planachromate werden sowohl für Tubuslänge 160 mm als auch für Tubuslänge ∞ hergestellt. Für die Auflichtmikroskopie ist die Objektivreihe ∞/0 vorgesehen. Für die Durchlichtmikroskopie gibt es die Objektivreihe 160/0,17. Sie kann an den meisten Durchlichtmikroskopen verwendet werden. Die Anwendung der Objektivreihe ∞/0,17 ist auf Spezialmikroskope beschränkt (z. B. Universalforschungsmikroskop NU, AMPLIVAL pol und PERAVAL interphako).

Planapochromate

Planapochromate sind apochromatisch korrigierte Objektive mit geebnetem Bildfeld. Ihr Farbverlauf entspricht dem der Apochromate (s. Kurve *3* im Bild 2.39). Für die Beseitigung der Bildfeldwölbung trifft das bei den Planachromaten Gesagte zu. Um eine Korrektion zu erreichen, die den Anforderungen der Apochromasie und der Planheit des Bildfelds genügt, ist ein sehr hoher Aufwand erforderlich. Planapochromate sind Objektive von höchster Leistung, die verwendet werden, um feinste Struktureinzelheiten bei größter Farbreinheit in einem großen Objektfeld zu untersuchen. In der Farbmikrofotografie sind sie allen anderen Objektivtypen überlegen.

Die chromatische Vergrößerungsdifferenz der Planapochromate ist wie bei den Planachromaten durch Kompensationsokulare auszugleichen. Es sind wegen des geebneten Bildfelds PK-Okulare zu verwenden.

Planapochromate werden wie die Planachromate sowohl für Tubuslänge 160 mm als auch für Tubuslänge ∞ hergestellt.

2.5.3. Objektive für spezielle Anwendungen

Spezielle mikroskopische Untersuchungsmethoden können häufig nur mit solchen Objektiven durchgeführt werden, die besonderen Anforderungen gerecht werden. Im folgenden werden Spezialobjektive beschrieben, die zur Anpassung an die Spezialmethoden besonders entwickelt wurden und sich von den bisher beschriebenen Objektiven in wesentlichen Merkmalen unterscheiden.

Objektive mit Segment für Universaldrehtische

Für polarisationsoptische Untersuchungen mit Universaldrehtischen, bei denen die Objektoberfläche gegen die optische Achse geneigt wird, wird das Objekt zwischen zwei Kugelsegmenten angeordnet, von denen sich eines im Objektraum des Objektivs befindet. Objektive für diese Anordnung erhalten ein S aufgraviert. Sie wurden für Tubuslänge 160 mm hergestellt; neuerdings für Tubuslänge ∞. Die Reihe der Achromate ∞/S besteht aus den drei Objektiven 5 ×/0,10; 16 ×/0,20 mit Iris und 32 ×/0,60 mit Iris. Sie sind mit PK-Okularen zu verwenden.

Die angegebenen Werte für die numerische Apertur und die Vergrößerung gelten nur in Verbindung mit dem Kugelsegment mit $n_D = 1{,}556$. Für die anderen zur Ausrüstung eines Universaldrehtisches gehörenden Kugelsegmente mit $n_D = 1{,}516$ und $n_D = 1{,}648$ ist sowohl die numerische Apertur als auch die Vergrößerung geringfügig kleiner oder größer, was ohne Belang ist.

Die Objektive können jedoch auch ohne Segment

verwendet werden, wenn ihr relativ großer Arbeitsabstand ausgenutzt werden soll. In diesem Fall der Anwendung ist die Änderung der Vergrößerung und der numerischen Apertur erheblich. Es sind beide Größen mit dem Faktor $1/n = 0{,}64$ zu multiplizieren, wobei n die Brechzahl des Segments ist. Aus der obigen Objektivreihe ∞/S wird dann $3{,}2\times/0{,}064$; $10\times/0{,}13$ und $20\times/0{,}38$. Diesen drei Objektiven entspricht der Reihe nach der freie Arbeitsabstand (Objekt bis unterer Fassungsrand) 12,8 mm, 9 mm und 8 mm. Wird das Segment weggelassen, so ändert sich auch die chromatische Vergrößerungsdifferenz geringfügig, was jedoch ohne Bedeutung ist.

Daß sich mit und ohne Segment eine andere numerische Apertur ergibt, ist aus der Definition $A = n \sin\sigma$ verständlich. Da die Segmentoberfläche konzentrisch zum axialen Objektpunkt verläuft, verläßt ein von diesem Objektpunkt ausgehendes Strahlenbündel das Kugelsegment ungebrochen. Der halbe Öffnungswinkel wird von der Öffnung des Objektivs bestimmt und ist mit und ohne Segment gleich. Somit ändert sich die numerische Apertur nur nach Maßgabe der Brechzahl des Segments n; ohne Segment ist $n = 1$. Für den Abbildungsmaßstab des Segments ergibt sich

$$M = ns'/n's = n,$$

weil $n' = 1$ und wegen der konzentrischen Anordnung der Segmentfläche $s' = s$ ist. Dieser Abbildungsmaßstab ist in die Vergrößerungsangabe der Objektive ∞/S einbezogen. Läßt man das Segment weg, so ist die Vergrößerung entsprechend V/n.

Objektive mit großem Arbeitsabstand

Die mikroskopischen Untersuchungsmethoden, bei denen Objektive mit großem Arbeitsabstand erforderlich sind, nehmen mehr und mehr zu. Da es sowohl Anwendungen gibt, bei denen das Objekt innerhalb einer Kammer (z.B. Heizkammer, Kühlkammer, Vakuumkammer) angeordnet ist, die durch ein Abschlußglas abgeschlossen ist, als auch solche Anwendungen, bei denen unbedeckte Objekte beobachtet werden sollen, sind hierfür Objektive zweckmäßig, die wahlweise beides ermöglichen.

Im Jahre 1964 wurde von *Riesenberg* [40] ein neues Objektiv angegeben, das außer einer planapochromatischen Korrektion bei einer mittleren numerischen Apertur einen sehr großen Arbeitsabstand hat und zusätzlich für bedeckte und unbedeckte Objekte anwendbar ist. Das Objektiv ist vom katadioptrischen Typ, d.h., die Strahlen werden von spiegelnden und brechenden Flächen beeinflußt (Bild 2.48). Die Hauptwirkung erfolgt durch einen großen Konkav- und einen kleinen Konvexspiegel, so daß es nach seinem grundsätzlichen Aufbau in die Reihe der Zweispiegelsysteme vom *Schwarzschildschen Typ* einzuordnen ist [37]. Von den bekannten optischen Systemen unterscheidet es sich im wesentlichen durch das Bauelement *3*, das in Verbindung mit dem Gesamtaufbau des Objektivs vorteilhafte Eigenschaften hat. Es hat günstigen Einfluß auf die Bildfeldebnung und die Erzielung eines großen Objektabstands. Es läßt sich mit dem Objektiv eine kleine, nicht störende Zentralabschattung erreichen (s. Abschn. 2.4.1.2.). Der apochromatische Farbverlauf des Objektivs ist mit normalen Glasarten erreichbar. Sein Öffnungsfehler ist außerordentlich gering und zeigt keine Änderung mit der Wellenlänge.

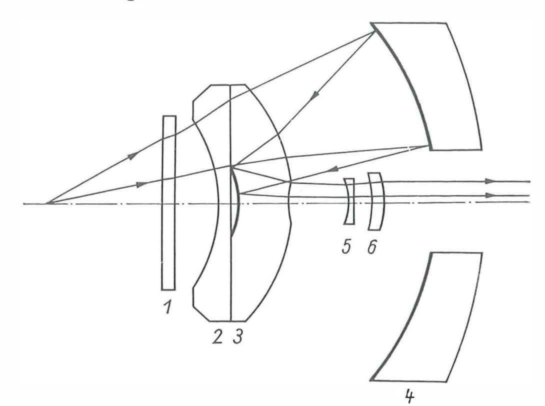


Bild 2.48. Strahlengang im planapochromatischen Spiegelobjektiv

12 mm dicke Planparallelplatte, entweder als Frontplatte am Objektiv angeschraubt oder als Abschlußglas einer Kammer; *3* optisches Bauelement (Spiegellinsenglied) mit rückflächenverspiegeltem Konvexspiegel; *4* Konkavspiegel; *2, 5, 6* Linsen

Ein Objektiv dieses Typs wurde mit der Vergrößerung $40\times$ und der numerischen Apertur 0,5 ausgeführt und im Bild 2.49 dargestellt. In die Korrektion ist eine planparallele Platte aus Quarzglas von 2 mm Dicke (bzw. aus BK 7 von 1,97 mm Dicke) einbezogen, die abschraubbar ist. Die Größe des freien Arbeitsabstands ist in Tafel 2.11 angegeben.

Bei abgeschraubter Planparallelplatte (Frontplatte) gilt die Gravierung $\infty/2$. Es muß dann zwischen Objekt und Objektiv als Deckglas eine planparallele Platte von 2 mm Dicke angeordnet

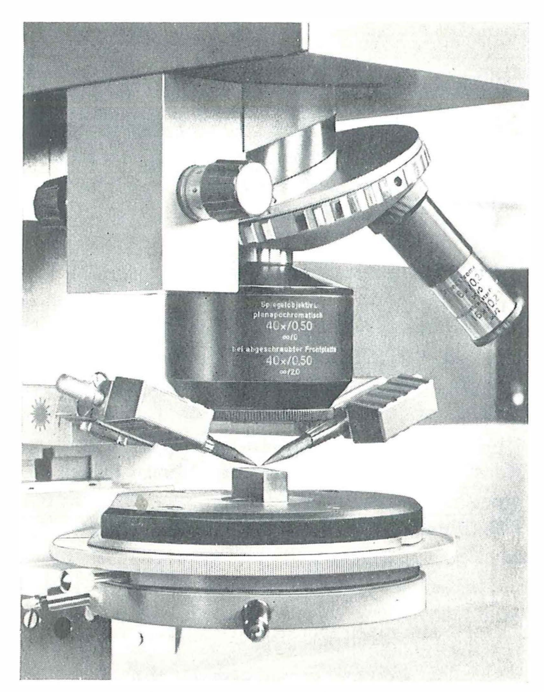


Bild 2.49. Spiegelobjektiv 40 × 0,50 L mit großem Arbeitsabstand und Planachromat 16 × /0,20 L am Lasermikroanalysator LMA 10 s. (Tafel 2.11)
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

sein, der z.B. die Funktion eines Abschlußglases und Einblickfensters für Kammern zukommt. Hierbei müssen einige Vorschriften beachtet werden, damit die hohe Abbildungsqualität des Objektivs nicht beeinträchtigt wird. Die Abweichung von der vorgeschriebenen Dicke der planparallelen Platte soll nicht mehr als $\pm 0{,}04$ mm betragen. Die Platte darf von ihrer rechtwinkligen Anordnung zur optischen Achse nur um etwa 12′ abweichen. Stärkere Verkippungen bewirken einen Komafehler, der die Bildgüte über das gesamte Bildfeld ungünstig beeinflußt. Diese Toleranzen sind sehr von der numerischen Apertur abhängig und erweitern sich für die Objektive geringerer Apertur erheblich.

Neben dem planapochromatischen Spiegelobjektiv 40 × /0,50 wurden Objektive schwächerer Vergrößerung mit großem Arbeitsabstand entwickelt, die zusammen mit dem Spiegelobjektiv eine Reihe bilden (s. Tafel 2.11), in der sämtliche Objektive die Abgleichlänge 75 mm haben. Die schwächeren Objektive sind vom Linsentyp.

Im Gegensatz zu (plan)apochromatischen Objektiven üblicher Bauart haben die Mikroskopobjektive mit großem Arbeitsabstand keinen Farbvergrößerungsfehler. Das bedeutet, daß das vom Objektiv erzeugte Bild im gesamten Feld bereits farbfehlerfrei ist und daher Okulare ohne chromatische Kompensationswirkung zu benutzen sind.

Wenn man auf die Abgleichung der Objektive untereinander verzichtet, kann bei den Objektiven bis zur numerischen Apertur $A = 0{,}2$ aufgrund der zulässigen Dickentoleranz (s. Bild 2.42) die Frontplatte weggelassen werden. Für die Beobachtung unbedeckter Präparate gilt dann der größere der angegebenen Arbeitsabstände abzüglich etwa 0,7 mm.

Die zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten können nur stichwortartig angedeutet werden. Bei abgeschraubter Frontplatte ist das bevorzugte Anwendungsgebiet die Mikroskopie von Objekten, die sich in Kammern (Vakuum-, Unterdruck-, Heiz-, Kühl-, Feuchtigkeits-, Flüssigkeitskammern) befinden. Es kommen Untersuchungen in der Metallurgie, der Silikattechnik, der Physik hoher und tiefer Temperaturen, der Vakuumphysik, der Supraleitungs-Physik und der Raumforschung in Betracht. Mit angeschraubter Frontplatte kann vor allem der große Arbeitsabstand, gegebenenfalls auch die Schutzwirkung der Frontplatte ausgenutzt werden. In dieser Anwendungsart sind die Objektive geeignet für Mikromanipulationen, z.B. in der Halbleitertechnik, bei biologischen und medizinischen In-vivo-Untersuchungen, in der chemischen Mikroskopie, bei verschiedenen Aufgaben der Meßtechnik und in anderen Fällen.

Ein besonderes Anwendungsgebiet ist die Mikroskopie mit Laserstrahlung, besonders die Laser-Mikrospektralanalyse. Hierfür werden Objektive in Spezialausführung hergestellt, die mit einem gravierten L gekennzeichnet sind (s. Tafel 2.11). Sie haben zwei Funktionen zu erfüllen. Das von der Laser-Strahlungsquelle ausgesandte schwach divergente Strahlungsbündel ist auf einem Brennfleck von möglichst kleiner Größe zu fokussieren, um am Ort des Fokus eine hohe Strahldichte zu erhalten, die bestimmte Effekte erzeugt (z.B. Materialverdampfung aus einem mikroskopisch kleinen Bereich zum Zweck der Emissionsspektralanalyse [31]). Die zweite Aufgabe der Objektive besteht in der genauen Einstellung des zu analysierenden (oder zu bearbeitenden) Objektdetails, der in den meisten Fällen eine mikroskopische Beobachtung des gesamten Präparats vorausgeht. Für die Erfüllung der Objektivfunktion und der speziellen Kondensorfunktion sind die L-Objektive besonders geeignet.

Tafel 2.11. Objektive mit großem Arbeitsabstand

Objektivbezeichnung	Brennweite mm	Freier Arbeitsabstand bei angeschraubter Frontplatte mm	Freier Arbeitsabstand bei abgeschraubter Frontplatte mm
Planachromat K 4×/0,05 ∞/0 bzw. ∞/2	62,5	38	40,8
Planapochromat K 8×/0,10 ∞/0 bzw. ∞/2	31,3	36,5	39,5
Planapochromat K 16×/0,20 ∞/0 bzw. ∞/2	15,6	14	17
Spiegelobjektiv, planapochromatisch 40×/0,50 ∞/0 bzw. ∞/2	6,25	17 (oder 15[1])	18,7
Planachromat L 16×/0,20 ∞/0 bzw. ∞/2	15,6	15,5	18,5
Spiegelobjektiv L, planapochromatisch 40× /0,50 ∞/0 bzw. ∞/2	6,25	17	18,7

∞/0 gilt bei angeschraubter Frontplatte.
∞/2 gilt bei abgeschraubter Frontplatte. In diesem Fall ist eine 2 mm dicke Planparallelplatte im Objektraum anzuordnen.
Zu verwenden sind Okulare ohne chromatische Kompensationswirkung, sog. A-Okulare oder P-Okulare.

[1]) Ausführung bis etwa 1970

Ist α der halbe Divergenzwinkel des nahezu parallelen Laserbündels, so erhält man nach Gl. (2.5) als Durchmesser des Brennflecks

$$2y = 2f' \tan\alpha .$$

Bei gleicher Divergenz des Laserbündels, die eine Eigenschaft der Laser-Strahlungsquelle ist, verhalten sich die Brennfleckdurchmesser wie die Brennweiten der fokussierenden Objektive. Ist die in einem Laserimpuls enthaltene Gesamtenergie gleich E, so ist die Energiedichte im Brennfleck vom Dmr. $2y$ dem Quadrat der Brennweite des Objektivs umgekehrt proportional:

$$\text{Energiedichte} = \frac{E}{\text{Fläche des Brennflecks}} = \frac{E}{\pi y^2} = \frac{E}{\pi \tan^2\alpha}\,\frac{1}{f'^2} \sim \frac{1}{f'^2}.$$

Je kleiner der Brennfleck und je höher die Energiedichte sein soll, um so kleiner muß die Brennweite gewählt werden. Da andererseits der Dmr. $2h$ des Laserbündels durch den Resonatortyp vorgegeben ist, erfordert aufgrund von

$$A = \frac{1}{2}\Omega = \frac{1}{2}\,\frac{2h}{f'} \quad \text{nach Gln. (2.47) und (2.48)}$$

eine kleine Brennweite eine große numerische Apertur. Das Spiegelobjektiv L mit der relativ kleinen Brennweite $f' = 6{,}25$ mm, der relativ großen numerischen Apertur $A = 0{,}5$ und dem großen Arbeitsabstand von 17 mm mit der schützenden Frontplatte ist deshalb besonders geeignet. Die geringfügige Zentralabschattung, die flächenmäßig etwa 10% beträgt, führt nur zu unbedeutendem Energieverlust. Der Durchmesser des Laserstrahlenbündels ist dem Durchmesser der Austrittspupille der L-Objektive, der 6,25 mm beträgt, anzupassen, gegebenenfalls mit einem afokalen Anpassungssystem.

Objektive für den ultravioletten und infraroten Spektralbereich

Objektive, die für den sichtbaren Spektralbereich vorgesehen sind, enthalten optische Gläser, die im ultravioletten und infraroten Spektralbereich nicht oder nur beschränkt durchlässig sind. Solche Objektive sind deshalb nur im sichtbaren Spektralbereich anwendbar, in beschränktem Maße auch für ein Spektralgebiet, das unmittelbar an das sichtbare Gebiet angrenzt. Für das eigentliche UV- und IR-Gebiet müssen Spezialobjektive verwendet werden.
Für das IR-Gebiet kommen katoptrische Spiegel-

objektive zum Einsatz, d. h. solche Objektive, die nur aus Spiegeln bestehen. Besonders eignen sich Zweispiegelsysteme aus einem großen Konkav- und einem kleinen Konvexspiegel, die konzentrisch angeordnet sind (s. Bild 2.17). Diese Objektive sind aplanatisch und frei vom Zweischalenfehler. Ihre Bildfeldwölbung ist etwas geringer als die von Achromaten und Apochromaten.

Bei völliger Farbfreiheit haben diese Systeme gute Abbildungseigenschaften über ein großes Objektfeld. Ihr Nachteil ist die verhältnismäßig große Zentralabschattung mit $\varrho \approx 0{,}45$ nach Gl. (2.55), was flächenmäßig zu etwa 20% führt.

In Tafel 2.12 sind zwei katoptrische Spiegelobjektive angeführt, von denen das Objektiv mit der numerischen Apertur $A = 0{,}65$ wegen seines Öffnungsfehlers nur für den infraroten Bereich verwendet werden sollte, während das Objektiv mit $A = 0{,}45$ auch für den sichtbaren und den ultravioletten Bereich anwendbar ist (Bild 2.50).

Für das UV-Gebiet wurden verschiedene Objektive entwickelt, die je nach der Anwendung Vor- und Nachteile haben.

Die ersten für die UV-Mikroskopie von *v. Rohr* [28] berechneten Objektive, die Quarz-Monochromate, sind nur für eine Wellenlänge sehr gut korrigiert. Sie bestehen aus einer Anzahl von Linsen aus Quarzglas. Die starke Abhängigkeit





Bild 2.50. Spiegelobjektive vom katoptrischen Typ (reine Spiegelsysteme), 20/0,45 160/0 und 40/0,65 160/0 Strahlengang s. Bild 2.17

des Bildorts von der Wellenlänge erfordert weitgehend monochromatisches Licht (spektrale Bandbreite nur einige zehntel Nanometer). Obwohl ihre optimale Korrektion je nach Objektiv bei den Wellenlängen 275 oder 257 nm liegt, können sie auch bei benachbarten Wellenlängen benutzt werden, wenn bei jeder Wellenlänge neu eingestellt wird. In einer ausführlichen Studie über den Korrektionszustand des Quarz-Monochromaten mit $A = 0{,}85$ und der Brennweite 2,5 mm, der für $\lambda = 257$ nm vorgesehen ist, konnte gezeigt werden [39], daß sich bei einer Definitionshelligkeit von 80% ein nutzbarer Wellenlängenbereich von 250 bis 265 nm ergibt. Die spektrale Bandbreite beträgt nur 0,3 nm. Infolge der

Tafel 2. 12. Objektive für den ultravioletten und infraroten Spektralbereich

Objektivbezeichnung	Typ¹)	Brennweite mm	Freier Objekt-abstand mm	Zentralabschattung linear $\varrho = \frac{A_{min}}{A_{max}}$	Zentralabschattung flächenmäßig %	Geeigneter Spektralbereich
Spiegelobjektiv 20/0,45 160/0	k	8,6	10,7	0,46	21	vornehmlich IR
Spiegelobjektiv 40/0,65 160/0	k	4,5	2,5	0,47	22	
UV-VIS-Apochromat 6,3/0,12 160/0,17	d	27,9	6,5	–	–	
Spiegelobjektiv 16/0,32 160/0,17	kd	12,5	3,7	0,33	11	
Spiegelobjektiv 63/0,65 160/0,17	kd	2,9	1,6	0,32	10	UV, VIS
Spiegelobjektiv WI 125/0,90 160/0,17	kd	1,5	0,45	0,35	12	

¹) k katoptrisches System (reines Spiegelsystem)
kd katadioptrisches System (Spiegellinsensystem)
d dioptrisches System (Linsensystem)

Sämtliche angeführten katadioptrischen Spiegelobjektive sind UV-VIS-apochromatisch.

Tafel 2.13. Quarz-Monochromate 160/0,17

Bezeichnung	Wellenlänge nm	Brennweite mm	Numerische Apertur	Freier Objektabstand mm
Trockensysteme	275	16	0,20	14,3
	275 } 257 }	6	0,35	3,3
Glyzerinimmersionen	275 } 257 }	2,5	0,85	0,36
	275 } 257 }	1,7	1,25	0,09

äußerst geringen spektralen Bandbreite und der Notwendigkeit, bei veränderten Wellenlängen neu zu fokussieren, sind die Monochromate unter heutigen Arbeitsbedingungen wenig geeignet. Für den Kadmium-Funken, der früher als Strahlungsquelle diente und eine Reihe diskreter Wellenlängen geringer Bandbreite ausstrahlt, sind die Monochromate bestens angepaßt und liefern sehr gute Mikrofotografien. Der VEB Carl Zeiss JENA hatte eine Reihe von Quarz-Monochromaten (Tafel 2.13) im Fertigungsprogramm, die heute nicht mehr produziert werden.

Die Bemühungen, UV-Objektive den modernen Arbeitsmethoden anzupassen, bei denen Strahlungsquellen mit kontinuierlichem Spektrum in Kombination mit Monochromatoren oder Filtersystemen mit größerer spektraler Bandbreite (etwa 5 nm und größer) verwendet werden, führten zur Entwicklung UV-VIS-achromatischer und UV-VIS-apochromatischer Objektive vom Linsen- oder Spiegellinsen-Typ. Reine Spiegelobjektive sind für den ultravioletten Spektralbereich aus verschiedenen Gründen wenig geeignet. Das Deckglas bedeckter Präparate würde einen erheblichen Farbfehler einführen. Der einfache Aufbau als Zweispiegelsystem erlaubt nur eine begrenzte numerische Apertur. Die große Zentralabschattung ist nachteilig.

Ein Objektiv wird UV-VIS-achromatisch genannt, wenn der Farbverlauf dem der Achromate (s. Kurve *1* im Bild 2.39) entspricht. Für zwei Wellenlängen im ultravioletten und im visuellen Bereich fallen die Bildorte zusammen, während die Bildorte für dazwischenliegende Wellenlängen zum Objektiv zu liegen (sekundäres Spektrum). Hinzu kommt eine Variation des Öffnungsfehlers mit der Wellenlänge. UV-VIS-apochromatisch sind Objektive, deren Farbverlauf dem der Apochromate (s. Kurve *3* im Bild 2.39) entspricht. Der sehr geringe Öffnungsfehler ändert sich mit der Wellenlänge praktisch nicht.

Mit Objektiven des Linsentyps ist UV-VIS-apochromatische Korrektion nur für verhältnismäßig kleine numerische Apertur möglich. Bei größerer numerischer Apertur sind Linsenobjektive nur UV-VIS-achromatisch (z.B. die Ultrafluare höherer Apertur der Firma Opton/Oberkochen). Falls vornehmlich bei einer Wellenlänge gearbeitet wird, z.B. beim Scanning-Verfahren (s. Abschn. 6.1.7.), ist die UV-VIS-achromatische Korrektion kein Nachteil. Verwendet man jedoch UV-VIS-achromatische Objektive bei fester Einstellung über ein größeres Spektralgebiet, so ergeben sich – bedingt durch das sekundäre Spektrum – beträchtliche Abweichungen von der zulässigen Definitionshelligkeit ($\eta = 80\%$), was zu einer Beeinträchtigung der Abbildungsqualität und in der Mikrospektralfotometrie zu Meßfehlern führt.

UV-VIS-apochromatische Objektive zeigen demgegenüber bei einmaliger Fokussierung über ein großes Spektralgebiet praktisch keine Änderung der Bildqualität. UV-VIS-apochromatische Korrektion wird bei mittleren und höheren Aperturen mit Spiegelobjektiven vom katadioptrischen Typ erreicht. Diese Objektive enthalten außer zwei Spiegeln (s. Bild 2.17) zusätzlich noch Linsen aus Quarzglas und Flußspat, wodurch eine hohe Abbildungsgüte bei geringer Zentralabschattung erzielt wird. Die noch verbleibende Zentralabschattung stört die Bildwiedergabe ebensowenig wie z.B. Restfehler der sphärischen Aberration, wenn sie innerhalb zulässiger Grenzen liegen.

Das für zentralabgeschattete Objektive anzuwendende Qualitätsmaß ist eine Erweiterung der Strehlschen Definitionshelligkeit und kann nach der Gleichung

$$\eta_{\text{ges}} = \eta_{\text{sph}} - \varrho^2$$

in zwei Anteile aufgespalten werden, wobei der Term η_{sph} das spezielle Qualitätsmaß für die sphärische Aberration ist und der Term ϱ^2

der Zentralabschattung Rechnung trägt. Nach Gl. (2.55) ist ϱ das Verhältnis der minimalen zur maximalen numerischen Apertur A_{min}/A_{max}. Dem Verhältnis der abgeschatteten Pupillenfläche zur gesamten Pupillenfläche des Objektivs entspricht ϱ^2. Damit keine spürbare Beeinträchtigung der Bildgüte auftritt, ist $\eta_{ges} > 0{,}8$ (80%) zu fordern. Die Größe η_{sph} – definiert als das Verhältnis der Intensität im Zentrum des Beugungsscheibchens eines mit sphärischer Aberration behafteten Objektivs zur entsprechenden Intensität eines sonst gleichen, jedoch ideal korrigierten Objektivs – ist abhängig von der Wellenlänge und für das katadioptrische Spiegelobjektiv WI 125/0,90 im Bild 2.51 dargestellt. Die ausgezogene Kurve gilt für den Fall, daß η_{sph} bei jeder Wellenlänge für die zugehörige günstigste Einstellebene berechnet wird. Diese Werte können dadurch erreicht werden, daß bei jeder Wellenlänge optimal fokussiert wird. Für den üblichen Gebrauch als UV-Objektiv – besonders für mikrospektralfotometrische Anwendungen – trifft die gestrichelte Kurve zu. Sie zeigt die Wellenlängenabhängigkeit der Größe η_{sph} für den Fall, daß sie im gesamten Spektralgebiet auf eine Einstellebene bezogen wird, und zwar im Beispiel auf $\lambda = 263$ nm. Man erkennt, daß über ein großes Spektralgebiet nahezu der Idealwert $\eta_{sph} = 1$ erreicht wird und daß auch bei fester Einstellung des Objektivs die Größe η_{sph} nur geringfügig schwankt. Zur Gesamtbeurteilung des Objektivs ist noch die wellenlängenunabhängige Größe $\varrho^2 = 0{,}12$ abzuziehen. Es ergibt sich, daß für einen großen Spektralbereich die Forderung $\eta_{ges} = 0{,}8$ durch das Spiegelobjektiv erfüllt wird.

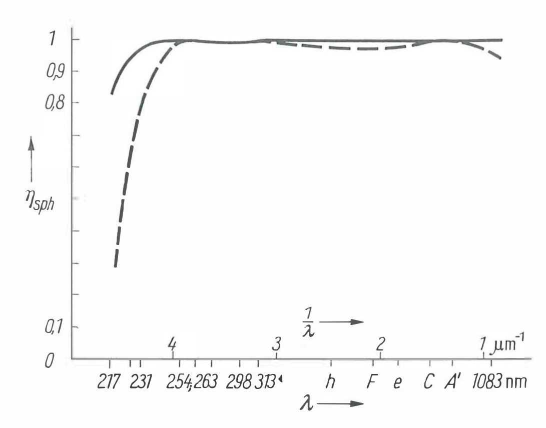


Bild 2.51. Definitionshelligkeit η_{sph} des Spiegelobjektivs WI 125/0,90 160/0,17 (katadioptrischer Typ) als Maß für die Bildgüte in Abhängigkeit von der Wellenlänge

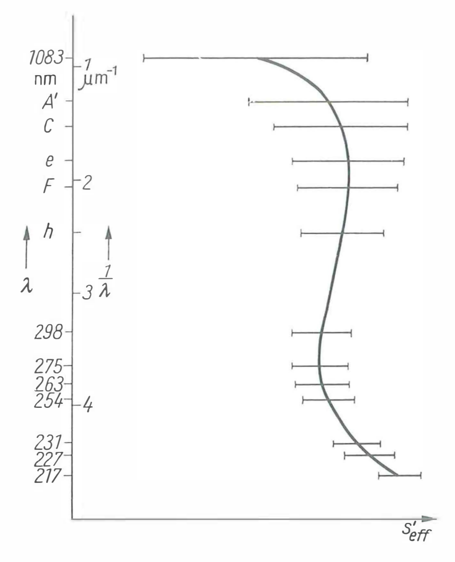


Bild 2.52. UV-VIS-apochromatischer Farbverlauf des Spiegelobjektivs WI 125/0,90 160/0,17

Im Bild 2.52 ist die Farbkurve dargestellt, die bei fester Einstellung des Objektivs die Lage der effektiven Bildorte in Abhängigkeit von der Wellenlänge angibt. Die für einige Wellenlängen eingezeichneten waagerechten Strecken geben die jeweilige Schärfentiefe nach Gl. (2.60b) an, die man auch als Einstelltoleranz auffassen kann. Da die Scharfeinstellung im ungünstigsten Fall so erfolgen kann, daß man sich am Rande des Schärfentiefebereichs befindet, erkennt man, daß die Scharfeinstellung z. B. bei $\lambda = 263$ nm für den längerwelligen Spektralbereich zur richtigen Fokussierung führt, daß dagegen die Scharfeinstellung im grünen Licht (*e*-Linie) nicht immer zur richtigen Fokussierung im Bereich kürzerer Wellenlängen (z. B. für $\lambda = 263$ nm) führt. Diese Tatsache, die auch für den Idealfall einer vollkommenen Farbkorrektion zutrifft (die Farbkurve würde sich dann als Gerade parallel zur Ordinate darstellen), führt zu der Forderung, bei feinen Objektstrukturen die Einstellung im UV vorzunehmen.

Tafel 2.12 gibt einen Überblick über Spezialobjektive für den IR-Bereich und UV-Bereich. Die Objektive haben die Abgleichlänge 45 mm. Die Objektive 160/0 sind für unbedeckte Präparate vorgesehen. Bei den Objektiven 160/0,17 ist ein Deckglas von 0,17 mm Dicke aus Quarzglas in die Korrektion einbezogen. Für das sichtbare Gebiet sind Okulare ohne Kompensationswirkung (A-Okulare) zu verwenden. Für das sicht-

bare und ultraviolette Spektralgebiet wurde ein Spiegelprojektiv entwickelt (s. Abschn. 6.1.6.). Zusammenfassende Darstellungen über Mikroskop-Spiegelobjektive gaben *Grey* [21] bis [23], *Norris* [33], *Riesenberg* [37].

Objektive für Lupenfotografie und Übersichtsbeobachtung

Für die einstufige Mikrofotografie oder Lupenfotografie sind Objektive üblich, die ihrem Aufbau nach fotografische Objektive sind (Triplet-Typ, Tessar-ähnlicher Typ). Von Zeiss JENA wurden sie unter dem Namen Mikrotare (Abkürzung Objektive M) eingeführt (Bild 2.53). Übersichten



Bild 2.53. Lupenfotografisches Objekt
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

über serienmäßig hergestellte lupenfotografische Objektive verschiedener Mikroskophersteller gibt *Michel* [549]. Eine Übersicht über die M-Objektive ist in Tafel 2.14 gegeben.
Bis auf die M-Objektive $f = 90$ mm mit Irisblende und $f = 120$ mm haben diese Objektive das genormte englische Gewinde wie die Mikroskopobjektive für Tubuslänge 160 mm.
Neuerdings werden für Übersichtsbeobachtungen und -aufnahmen in zunehmendem Maße Objektive sehr geringer Maßstabszahl verwendet, die zusammen mit Okularen oder Projektiven die zweistufige Abbildung im zusammengesetzten Mikroskop ermöglichen. Ein Objektiv dieser Art ist der Planachromat 1/0,03 160/–, der an eine Spezialfassung geschraubt wird, die gegen den üblichen Objektivrevolver austauschbar ist. Beim Wechsel bleibt die Objektiv-Bild-Entfernung erhalten, so daß im erweiterten Sinne von einer Abgleichung des schwachen Objektivs mit den stärkeren gesprochen werden kann. Das Objektiv kann auch an den Objektivrevolver geschraubt werden. Es ist jedoch dann mit den anderen Objektiven nicht abgeglichen. Das Spezialobjektiv ist ohne Kondensor zu verwenden, da es frontseitig eine Feldlinse enthält, die als Kondensor wirkt.

Tafel 2.14. M-Objektive

Brennweite mm	Öffnungsverhältnis $\Omega = 2h/f$	Bemerkung
10	1 : 1,6	
15	1 : 2,3	
20	1 : 3,2	mit und ohne
30	1 : 4,5	Irisblende
45	1 : 4,5	
60	1 : 4,5	
90	1 : 6,3	
120	1 : 6,3	
165 (Tessar)	1 : 6,3	mit Irisblende

2.5.4. Objektive für Polarisation, Phasenkontrast und Dunkelfeld

Objektive für Polarisation können Achromate, Planachromate, in Sonderfällen auch Planapochromate sein. Die Objektive enthalten Gläser, die präzisionsgekühlt sind, so daß ihre Spannungsdoppelbrechung auf einen unschädlichen Betrag sinkt. Sie werden besonders sorgfältig gefaßt, zusätzlich durch Prüfung auf weitestgehende Freiheit von Spannungsdoppelbrechung ausgesucht und mit Pol graviert. Bei den Planachromaten Pol wird der geringfügige Rest an Spannungsdoppelbrechung, den die Objektive trotz aller Sorgfalt bei der Fertigung noch haben können, dadurch unwirksam gemacht, daß jede Objektivaufnahme am Objektivrevolver individuell an das aufzunehmende Objektiv optimal angepaßt wird. Bei gekreuzter Polarisator-Analysator-Stellung herrscht dann größtmögliche Dunkelheit. Der Benutzer hat nur darauf zu achten, daß die durch Nummern gekennzeichnete Zuordnung zwischen Objektiv und Objektivaufnahme eingehalten wird. Die Objektive mit Segment für die Verwendung am Universaldrehtisch (s. Abschn. 2.5.3.) sind Spezialobjektive für Polarisation und werden nicht zusätzlich mit Pol gekennzeichnet. Bei Objektiven, die nicht für die Polarisationsmikroskopie vorgesehen sind, stören geringfügige Verspannungen die Abbildung nicht. Qualitative Polarisationsuntersuchungen im Durchlicht können mit normalen Objektiven durchgeführt werden, wenn es nicht auf das Erkennen besonders schwach doppelbrechender

Tafel 2.15. Reihen von Pol-Objektiven

Pol-Objektive	Anwendung
Achromate ∞/S	AMPLIVAL pol d, pol u, NU mit Universaldrehtisch
Achromate 160/0,17	LABOVAL pol d, u
Planachromate ∞/0 (Trockenreihe, Immersionsreihe)	NEOPHOT, NU, AMPLIVAL pol u
Planachromate ∞/0,17	NU, AMPLIVAL pol d, AMPLIVAL pol u
Objektive K mit großem Arbeitsabstand ∞/0 bzw. ∞/2	Anwendungen s. Abschn. 2.5.3.

Objekte ankommt. Die Durchführung qualitativer Polarisationsuntersuchungen im Auflicht erfordert besondere Maßnahmen bei der Objektivaufnahme. In Tafel 2.15 ist eine Übersicht der verschiedenen Pol-Objektive und ihrer Verwendung an verschiedenen Mikroskopen gegeben.

Objektive für Phasenkontrast unterscheiden sich von normalen Objektiven durch die am Ort oder in der Nähe des hinteren Brennpunkts der Objektive enthaltenen Phasenringe oder Phasensektoren. Bei zwei Ringen unterschiedlicher Breite werden sie im Hinblick auf den damit erzielbaren veränderlichen Phasenkontrasteffekt mit Phv, sonst mit Ph gekennzeichnet. Im Abschn. 6.1.2. wird noch näher darauf eingegangen.

Bei normaler Hellfeldbeobachtung sollten Phasenkontrastobjektive nicht verwendet werden, weil die phasendrehende und absorbierende Wirkung der Phasenringe bei dieser Beobachtungsart die abbildende Wellenfläche störend beeinflußt.

Grundsätzlich kann das Phasenkontrastverfahren mit jedem Mikroskopobjektiv durchgeführt werden, wenn durch Zwischenabbildung die erforderliche Abbildung von Ringblenden auf Phasenringe außerhalb des Mikroskopobjektivs erzeugt wird.

Bei den Objektiven für Dunkelfeld ist zu unterscheiden, ob es sich um Durchlicht-Dunkelfeld oder Auflicht-Dunkelfeld handelt. Von den verschiedenen Arten des Dunkelfelds kommt hier nur das allseitig ringförmige Dunkelfeldverfahren in Betracht.

Beim Durchlicht-Dunkelfeld werden grundsätzlich gewöhnliche Objektive benutzt. Die Dunkelfeldwirkung wird durch spezielle Kondensoren erzeugt, die eine extrem große Zentralabschattung $\varrho = A_{\min}/A_{\max}$ haben. Die innere Beleuchtungsapertur $A_{\min}$ muß größer als die numerische Apertur des Objektivs sein, damit kein direktes Licht in das Objektiv gelangt. Beim Kardioidkondensor beträgt z.B. die innere Apertur 1,05. Soll bei Objektiven hoher numerischer Apertur, besonders bei Immersionsobjektiven, noch Dunkelfeld erzeugt werden, sind Objektive mit Irisblende zu benutzen, die eine Drosselung der Beobachtungsapertur ermöglichen. Dunkelfeld kann bei Objektiven geringer Apertur mit üblichen Spiegelkondensoren erzeugt werden. Eine geeignete Kombination ist z.B. der Spiegelkondensor 0,6, dessen innere Apertur 0,28 beträgt, mit dem Achromaten 16/0,25 160/0,17. Durch Einlegen von Zentralblenden kann bei dafür geeigneten Hellfeldkondensoren eine Zentralabschattung künstlich hergestellt werden.

Beim Auflicht-Dunkelfeld werden entweder gewöhnliche Objektive benutzt, die von einem separaten Dunkelfeldkondensor umgeben werden, oder es werden Spezialobjektive verwendet, bei denen der Dunkelfeldkondensor mit dem Objektiv eine Einheit bildet. Im erstgenannten Fall werden separate Dunkelfeld-Hohlspiegelkondensoren verwendet, die, zu jedem Objektiv passend, mit dem Objektiv auf einen gemeinsamen Objektivschlitten aufgeschraubt werden. Mit dieser Anordnung ist an dafür geeigneten Mikroskopen sowohl Auflicht-Hellfeld- als auch Auflicht-Dunkelfeldbeobachtung möglich. Bei Spezialobjektiven für Auflicht-Hellfeld und Auflicht-Dunkelfeld (Abkürzung HD) ist das eigentliche Objektiv in ein Ringspiegel- oder Ringlinsensystem eingebaut.

2.6. Okulare und Projektive

Das von einem mikroskopischen Objekt der Größe OB in der ersten vergrößernden Abbildungsstufe erzeugte Zwischenbild $O'B'$ wird im zusammengesetzten Mikroskop in der zweiten Abbildungsstufe durch ein Okular oder ein Projektiv (okularähnliches optisches System) weiter vergrößert. Der Strahlengang wird in den Bildern 2.11. und 2.12 gezeigt. Wie die vergrößernde Wirkung des Okulars zustande kommt, ist in den Abschnitten 2.1.7.3. und 2.2. erläutert. Die spezifische Okularwirkung, die auch für Projektive zutrifft, beruht darauf, daß Strahlenbündel von geringem Öffnungswinkel und kleiner Hauptstrahlneigung in solche größerer Hauptstrahlneigung umgewandelt werden, wäh-

rend die Divergenzänderung der Strahlenbündel gering ist. Dies führt dazu, daß bei Okularen und Projektiven vornehmlich die Feldfehler, wie Astigmatismus schiefer Bündel (Zweischalenfehler), Bildfeldwölbung, Verzeichnung und Farbvergrößerungsfehler, eine Rolle spielen, während der Öffnungsfehler, die Koma und auch die axialen Farbfehler meist zu vernachlässigen sind. Bei Okularen und Projektiven kommt es darauf an, diese Feldfehler möglichst klein zu halten, damit sie nicht stören, oder sie so zu korrigieren, daß sie noch bestehende Rest-Feldfehler der Objektive kompensieren.

Aus dieser Betrachtung ergibt sich, daß die für die visuelle Mikroskopie bestimmten Okulare und die für die Mikrofotografie und Mikroprojektion bestimmten Projektive in grundsätzlichen Eigenschaften, die z.B. die Bauformen betreffen, weitgehend übereinstimmen. Unterschiede gibt es hinsichtlich der Forderung für die Lage der Austrittspupille (*AP*). Während bei Okularen die *AP* genügend weit entfernt von der dem Auge zugewandten Austrittsfläche des Okulars liegen muß, damit die Augenpupille an den Ort der *AP* gebracht werden kann, kann diese Forderung für Projektive entfallen. Ferner sind die Projektive den Bedingungen der Mikrofotografie und Mikroprojektion, z.B. einem bestimmten Abstand zwischen Zwischenbild und Endbild, optimal angepaßt. Projektionssysteme negativer Brennweite, z.B. die Homale, nehmen eine Sonderstellung ein. Sie haben auch in der Bauform keinerlei Ähnlichkeit mit den Okularen.

2.6.1. Okulare

2.6.1.1. Anpassungsmaße

Das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild entsteht in einer bestimmten Entfernung unterhalb des oberen Tubusrands, der als Okular-Anlagefläche dient (Bilder 2.41 und 2.54). Bei den Mikroskopen des VEB Carl Zeiss JENA beträgt diese Entfernung l_{Ok} = 13 mm (Abgleichlänge der Okulare). Die Okulare sind so gefaßt, daß ihr vorderer Brennpunkt um die Strecke l_{Ok} = 13 mm vor der Okular-Anlagefläche liegt. Dadurch wird das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild im Unendlichen abgebildet, wie es für die Beobachtung mit auf unendlich akkommodiertem Auge zu fordern ist. Bei davon abweichender Akkommodation wird die richtige Einstellung durch geringfügige Fokussierung des gesamten Mikroskops erreicht.

Der Durchmesser des Fassungsteils der Okulare, der in den Tubus eingesteckt wird, ist international standardisiert und beträgt 23,2 mm. Bei Okularen mit weitem Steckdurchmesser beträgt er 30 mm. Sie erfordern spezielle Tuben. Der Durchmesser des dem Auge zugewandten Fas-

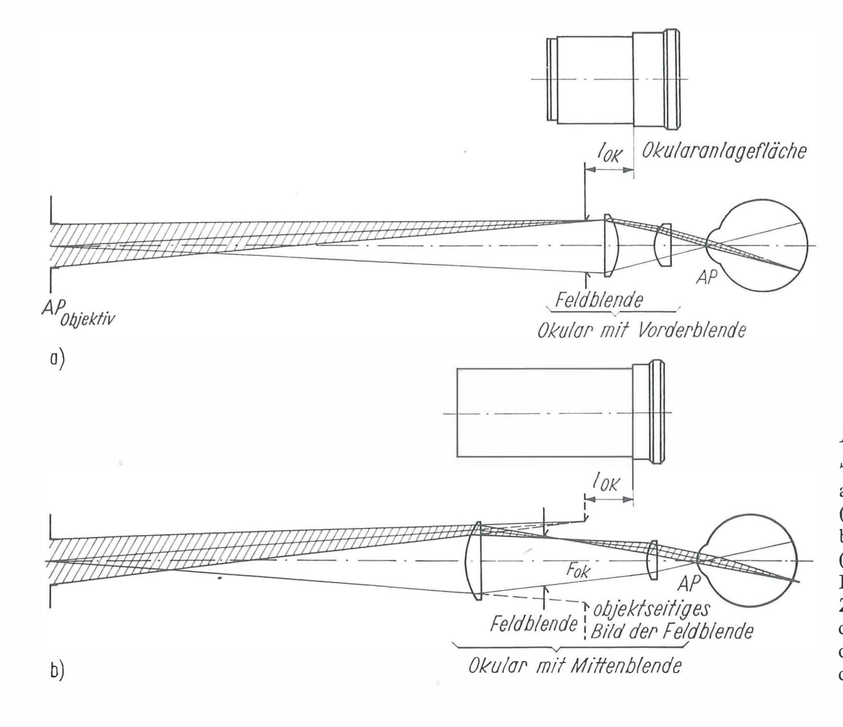


Bild 2.54.
Strahlengang im Okular
a) Okular mit Vorderblende (Ramsdenscher Typ).
b) Okular mit Mittenblende (Huygensscher Typ)
Das vom Objektiv entworfene Zwischenbild liegt um die Strecke l_{Ok} unterhalb des oberen Tubusrands bzw. der Okular-Anlagefläche

sungsteils der normalen Okulare beträgt 28 mm. Es können standardisierte Zubehörteile aufgesetzt werden, z. B. Sperrfilter für die Fluoreszenzmikroskopie, Aufsetzanalysatoren für polarisationsoptische Untersuchungen oder aufsteckbare Augenmuscheln.

2.6.1.2. Grundsätzlicher Aufbau von Okularen mit Vorder- und Mittenblende

Um eine scharfe Begrenzung des abgebildeten Felds zu erzielen, enthalten die Okulare eine kreisförmige Feldblende, die man auch Sehfeldblende nennt (FB_2 im Bild 2.13). Bei Okularen, deren vorderer Brennpunkt vor dem optischen System des Okulars liegt, ist die Feldblende in der vorderen Brennebene angeordnet: Okular mit Vorderblende (Bild 2.54a). Die Feldzahl eines Okulars mit Vorderblende gibt den Durchmesser dieser Blende an. Ein typischer Vertreter eines Okulars mit Vorderblende ist das Ramsdensche Okular (Bild 2.54a). Die in der Nähe des Zwischenbilds angeordnete Feldlinse oder Kollektivlinse bewirkt in erster Linie eine Neigungsänderung der Hauptstrahlen, während die dem Auge zugewandte Augenlinse mehr als Lupe wirkt. Okulare von schwächerer Vergrößerung haben häufig einen Aufbau, wie er im Bild 2.54b gezeigt wird. Okulare dieser Art werden als Huygenssche Okulare bezeichnet. Bei ihnen liegt die Feldblende inmitten des Okulars an der Stelle, an der das vom Objektiv erzeugte und von der Feldlinse des Okulars abgebildete Zwischenbild liegt. Die Feldzahl bei Okularen mit Mittenblende gibt den Durchmesser des objektseitigen Bilds dieser Blende an, während der Durchmesser der Feldblende selbst unmaßgeblich ist.

2.6.1.3. Okulartypen

Von dem grundsätzlichen Aufbau des Huygensschen und Ramsdenschen Okulars sind mehrere Okulartypen abgeleitet. Die Bezeichnung erinnert entweder an den, der den Okulartyp angegeben hat, oder sie weist auf eine wesentliche Funktion des Okulars hin. Ein Okular vom Ramsdenschen Grundaufbau mit verkitteter Augenlinse wird Kellnersches Okular genannt. Ein Okular mit Mittenblende, bei dem die Petzvalsche Bedingung erfüllt werden kann, ist das Kerbersche Okular. Bei ihm ist objektivseitig eine Negativlinse angeordnet, während der folgende Teil des Okulars dem Huygensschen oder dem Ramsdenschen ähnelt. Ein von *Abbe* angegebener Okulartyp ist unter der Bezeichnung orthoskopisches Okular bekannt. Es hat Vorderblende, dahinter sind eine dreiteilige Kittlinse und eine Einzellinse angeordnet. Die strenge Aufteilung in Feldlinse und Augenlinse ist hier nicht mehr gegeben. Die Bezeichnung weist darauf hin, daß durch das Okular eine weitgehend verzeichnungsfreie Abbildung erfolgt. Schwächere orthoskopische Okulare sind vom Kellnerschen Typ. Okulare mit geebnetem Bildfeld und großem Bildfeldwinkel weichen mitunter von diesen klassischen Okulartypen ab. Bei den periplanatischen Okularen der Firma E. Leitz, die z. B. vom Huygensschen Typ mit verkitteter Augenlinse sein können, ist durch Einführung eines Zweischalenfehlers die sagittale Schale nahezu geebnet, während die meridionale Schale so gekrümmt ist, daß ihre hohle Seite zum Objektiv hin weist. In Verbindung mit Planobjektiven, bei denen ein entsprechender Zweischalenfehler eingeführt wird, ergibt sich ein astigmatismusfreies, geebnetes Endbild [19]. In Verbindung mit Objektiven ohne Bildfeldebnung vermindert sich die meridionale Bildfeldwölbung. Von *R. Winkel* wurden ähnliche Okulare als komplanatische Okulare hergestellt. Planokulare sind ihrer Korrektion nach den Erfordernissen der Planobjektive angepaßt, so daß sich ein geebnetes und astigmatismusfreies Endbild ergibt. Großfeld- oder Weitwinkelokulare nennt man solche, deren Bildfeldwinkel eine gewisse Mindestgröße überschreitet. Die Festlegung dieser Mindestgröße ist noch willkürlich. Vom Großfeldokular wird dann gesprochen, wenn der durch das Okular abgebildete Bildfelddurchmesser, in einer Entfernung von 250 mm von der Austrittspupille aus betrachtet, mindestens 175 mm beträgt.

Beispiel:

Ein Okular 6,3× mit der Feldzahl 28 mm ergibt einen Bildfelddurchmesser von 176 mm und wird von der Firma E. Leitz als Großfeldokular bezeichnet. Es hat einen Bildfeldwinkel $2\sigma_p \approx 39°$. Nur Großfeldokulare geringer Vergrößerung müssen einen Steckdurchmesser haben, der größer als 23,2 mm ist. Es ist dann ein Steckdurchmesser von 30 mm gebräuchlich. Bereits ein Großfeldokular mit $V_{Ok} = 10\times$ kann mit dem engen Steckdurchmesser ausgeführt werden.

Okulare mit chromatischer Vergrößerungsdifferenz, die den Farbvergrößerungsfehler von Objektiven kompensieren, heißen Kompensationsokulare. Sie können dem Aufbau nach unterschiedlich sein. So entstehen z. B. aus dem

Huygensschen Typ Kompensationsokulare, wenn die Augenlinse verkittet wird. Bei den Kompensationsokularen des VEB Carl Zeiss JENA beträgt die chromatische Vergrößerungsdifferenz zwischen den Farben C′ und F′ etwa 1,5%. Bei Kompensationsokularen wird der Rand der Feldblende farbig abgebildet.

Bei den stellbaren oder einstellbaren Okularen ist der Teil des Okulars in axialer Richtung verstellbar, der hinter der Blende angeordnet ist. Damit ist gewährleistet, daß der Beobachter seinem Akkommodationszustand entsprechend auf die Blende oder eine in der Blendenebene angeordnete Strichplatte scharf einstellen kann. Meßokulare sind immer stellbar. Bei binokularem Sehen kann es vorteilhaft sein, neben einem festen Okular ein stellbares zu verwenden, um Augenfehler auszugleichen.

Fotookulare sind stellbare Okulare mit dem Zweck, neben visueller Beobachtung die Scharfeinstellung des Bilds bei kürzeren Projektionsentfernungen zu ermöglichen, ohne daß das Mikroskop umfokussiert werden muß, was bekanntlich nachteilig ist (s. Abschn. 2.2.1.3.). Die Fokussierung des Mikroskopobjektivs bleibt erhalten, weil das Zwischenbild in der unverändert bleibenden Blendenebene des Fotookulars abgebildet wird. Der hinter der Blendenebene angeordnete Teil des Okulars ist verstellbar und mit einer Entfernungseinteilung für unterschiedliche Kameralängen versehen. Fotookulare werden heute nicht mehr hergestellt. Für Mikrofotografie und Mikroprojektion werden Projektive verwendet.

Brillenträger-Okulare sind Okulare mit besonders großem Abstand der Austrittspupille von der Augenlinse, um den Beobachtern mit Brille zu ermöglichen, die Augenpupille an den Ort der Austrittspupille zu bringen.

Pankratische Okulare sind optische Systeme zur kontinuierlichen Änderung der Vergrößerung bei festbleibendem Bildort. Das pankratische System ist in einem speziellen Tubus angeordnet (Pankratik-Tubus) oder in größeren Mikroskopen als Geräteoptik eingebaut. Bei visuellem Gebrauch sind hinter dem pankratischen System normale Tuben angeordnet, die normale Okulare aufnehmen.

2.6.1.4. Bildfeldgröße des Okulars und ihr Zusammenhang mit der Objektfeldgröße

Zwischen dem Durchmesser des Objektfelds $2y$ eines Mikroskops und der Feldzahl $2y'$ des Okulars bestehen die in Gl. (2.50) angegebenen Beziehungen. Wenn zwischen Objektiv bzw. Objektiv mit Tubuslinse und Okular zusätzliche Optik angeordnet ist, die eine Änderung der Vergrößerung bedingt, ist deren Vergrößerungsfaktor zu berücksichtigen.

Sieht man in ein Okular hinein, so entsteht ein bestimmter Eindruck über die Größe des überschaubaren Felds, der allein vom Bildwinkel $2\sigma'_p$ abhängig ist, den die von der Feldblende begrenzten Hauptstrahlen in ihrem Kreuzungspunkt – der Austrittspupille – miteinander bilden. Der Bildwinkel läßt sich bei bekannter Okularvergrößerung V_{Ok} und der Feldzahl des Okulars $2y'$ nach der Gl. (2.51) berechnen:

$$\tan \sigma'_P = \frac{2y' V_{Ok}}{500}$$

$$= \frac{\text{Feldzahl} \times \text{Okularvergrößerung}}{500}. \qquad (2.92)$$

Eine anschaulichere Vorstellung von der Größe des vom Okular überschaubaren Felds gewinnt man, wenn man die Bildgröße $2y''$ angibt, wie sie von der Austrittspupille aus in der konventionellen Sehweite $w = 250$ mm erscheint. Zwischen dem (halben) Bildwinkel σ'_p und der (halben) Bildgröße y'' besteht die einfache Beziehung $\tan \sigma'_P = y''/250$. Somit wird

$$2y'' = 2y' V_{Ok} \qquad (2.93)$$

$$\left.\begin{array}{l}\text{Bildfelddurchmesser,}\\ \text{in 250 mm von der } AP\\ \text{aus gesehen.}\end{array}\right\} = \begin{array}{l}\text{Feldzahl} \times\\ \text{Okularvergrößerung}\end{array}$$

Das Produkt aus Feldzahl des Okulars und Okularvergrößerung ist entscheidend für die Größe des in einem Okular überschaubaren Felds. Es wird von einem Großfeldokular gesprochen, wenn das Produkt $\gtrsim 175$ mm ist. Zwischen dem (halben) Bildwinkel eines Okulars und der Größe des Objektfelds $2y$ in der Objektebene des Mikroskops besteht die Gleichung

$$2y = \frac{500 \tan \sigma'_P}{V_{Mikr}}, \qquad (2.94)$$

d.h., das überschaubare Objektfeld ist bei einer bestimmten Mikroskopvergrößerung dem Tangens des halben Bildwinkels und damit nach Gl. (2.92) dem Produkt aus Feldzahl und Okularvergrößerung direkt proportional. Durch Steigerung des Bildwinkels des Okulars erhält man einen echten Gewinn an Objektfeldgröße, da die Mikroskopvergrößerung V_{Mikr} nach dem Gesichtspunkt der förderlichen Vergrößerung zu wählen ist, die auf der numerischen Apertur des Objektivs basiert

und mit den abgebildeten Feldern selbst nichts zu tun hat. Es bestehen allerdings unterschiedliche Ansichten darüber, bei welchem Bildwinkel noch bequem zu mikroskopieren ist. Bei kleineren Bildwinkeln erfaßt man das gesamte Bildfeld gewissermaßen mit einem Blick, während das Auge bei größerem Bildwinkel gezwungen wird, das Bildfeld durch Blicke abzutasten. Bei einer derartigen Beobachtung müßte der Augendrehpunkt mit der Austrittspupille zusammenfallen, was zu der Forderung führt, daß die *AP* weit oberhalb des Okulars liegt. Ist das nicht der Fall, so erzwingen Okulare mit sehr großen Bildwinkeln eine Kopfbewegung. Es entsteht eine Art Schlüssellochbeobachtung, die unbequem ist.

2.6.1.5. Kennzeichnung der Okulare – Okularübersicht

Zur Kennzeichnung der Okulare ist die Angabe des Korrektionstyps, der Okularvergrößerung und der Feldzahl erforderlich. Okulare des VEB Carl Zeiss JENA werden nach dem Korrektionszustand eingeteilt in

A-Okulare

Allgemeinokulare ohne chromatische Vergrößerungsdifferenz

AK-Okulare

Allgemeinokulare mit Kompensationswirkung. Sie haben chromatische Vergrößerungsdifferenz, die der Kompensierung der chromatischen Vergrößerungsdifferenz von Objektiven dient.

P-Okulare

Planokulare ohne chromatische Vergrößerungsdifferenz. Sie sind Großfeldokulare, die durch ihren besseren Korrektionszustand besonders geeignet sind in Verbindung mit Planobjektiven, die

Tafel 2.16. Übersicht über Mikroskopokulare

Okularbezeichnung Kennzeichen für den Korrektionstyp	Vergrößerung	Feldzahl	Feldzahl × Vergrößerung (= Bildfelddurchmesser, in 250 mm von der AP aus gesehen) mm	Bildwinkel ($2\sigma'_P$) ° (Grad)
A	5×	23	115	25,9
	6,3×	19	120	27,0
	8×	12	96	21,7
	10×	14	140	31,3
	10×	20	200	43,6
	12,5×	16	200	43,6
	16×	12,5	200	43,6
	20×	10	200	43,6
AK	8×	16	128	28,7
	12,5×	12	150	33,4
P	10×	20	200	43,6
	16×	12,5	200	43,6
	25×	8	200	43,6
PK	6,3×	19	120	27,0
	8×	18,4	147	32,8
	10×	15,5	155	34,4
	12,5×	16	200	43,6
	16×	12	192	42,0
	20×	8	160	35,5
	25×	7	175	38,6
	32×	6,3	200	43,6
Okulare	6,3×	28	176	38,8
für SM XX	12,5×	15	187	41,0
und TECHNIVAL	25×	8	200	43,6

keine chromatische Vergrößerungsdifferenz haben.

PK-Okulare

Planokulare mit Kompensationswirkung. Durch ihren besseren Korrektionszustand sind sie besonders geeignet in Verbindung mit Planobjektiven, die chromatische Vergrößerungsdifferenz haben.

Manchmal wird noch die Brennweite des Okulars angegeben, die mit der Okularvergrößerung in der Beziehung $f_{Ok} = 250/V_{Ok}$ steht. Ferner kann die Lage der Austrittspupille oberhalb des Okulars angegeben werden, wobei auf eine durchschnittliche Lage der Eintrittspupille des Okulars Bezug genommen wird, die mit der Austrittspupille des Objektivs übereinstimmt.
Eine Übersicht über die Mikroskopokulare des VEB Carl Zeiss JENA, die jedoch keine Vollständigkeit beansprucht, ist in Tafel 2.16 gegeben. Die Okulare zum Stereomikroskop SM XX sind Okulare mit Steckdurchmesser 30 mm, die keine chromatische Vergrößerungsdifferenz haben.
Früher wurde auch noch eine Reihe PK-Okulare mit weitem Steckdurchmesser gefertigt.

2.6.2. Projektive

Für die Mikrofotografie und Mikroprojektion werden Projektive verwendet. Die Projektive sind für eine bestimmte Objekt-Bild-Entfernung korrigiert und so gefaßt, daß sie das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild auf die Auffangebene, Filmebene u. ä. abbilden.

MF-Projektive

Bei den Projektiven für die mikrofotografische Einrichtung MF beträgt die Objekt-Bild-Entfernung 160 mm. Sie sind damit für die Kameralänge dieser mikrofotografischen Einrichtung optimal korrigiert und abgeglichen. Sie haben denselben Steckdurchmesser wie die Okulare. Zur Unterscheidung von den Okularen werden die MF-Projektive durch ihren Abbildungsmaßstab gekennzeichnet. Es gibt MF-Projektive mit und ohne Kompensationswirkung (Tafel 2.17).
Bei den MF-Meßprojektiven 4:1, K 4:1 und K 8:1 können Okularmaßstabsplatten eingelegt werden. Die Feldzahl der MF-Projektive ist so gewählt, daß das Format der MF-Kamera sowie das der Aufsetzkameras voll ausgeleuchtet wird.

Tafel 2.17. MF-Projektive

„MF"-Projektiv	Abbildungsmaßstab M_{Proj}	Feldzahl mm	Brennweite mm
Ohne	4 : 1	11	24,61
Kompenswirkung	6,3 : 1	7	18,55
Mit	3,2 : 1	13,8	35,69
Kompenswirkung	4 : 1	11	24,76
Bezeichnung K	5 : 1	8,8	21,77
	6,3 : 1	7	18,52
	8 : 1	5,5	15,53
	10 : 1	4,4	13,00

Projektive für die Mikroprojektion

Für die Mikroprojektion auf größere Projektionsentfernungen, z.B. in Verbindung mit dem Mikroprojektionsgerät PICTOVAL, sind Projektive besonders großer Brennweite erforderlich. Sie haben den gleichen Steckdurchmesser wie Okulare (23,2 mm). Die Projektive haben Kompensationswirkung (Tafel 2.18).

Tafel 2.18. Projektive für Mikroprojektion großer Projektionsentfernung

Projektiv-Brennweite mm	Lupenvergrößerung $250/f$	Feldzahl mm
63	4×	20
100	2,5×	20
160	1,6×	20

Den Durchmesser des Projektionsbilds $2y''$ erhält man aus der Feldzahl $2y'$ und dem Abbildungsmaßstab des Projektivs M_{Proj}, der mit der Projektionsentfernung k in dem Zusammenhang $M_{Proj} = k/f_{Proj}$ steht.

$$2y'' = 2y' \, M_{Proj} = 2y' \, \frac{k}{f_{Proj}}.$$

Beträgt z.B. die Projektionsentfernung k das 100fache der Projektiv-Brennweite (bei den angegebenen Projektiven der Reihe nach 6,3, 10; 16 m), so beträgt der Durchmesser des projizierten Bilds 2 m. Aus dem konstanten Abbildungsmaßstab für die drei angeführten Fälle $M_{Proj} = 100:1$ folgt, daß die bildseitige numerische Apertur $A'' = A'/M_{Proj}$ ebenfalls konstant ist (A' ist durch das verwendete Objektiv vor-

gegeben), so daß die Beleuchtungsstärken in den drei Fällen ebenfalls gleich sind.

Homale

Homale sind Projektionssysteme negativer Brennweite, die in Verbindung mit apochromatischen Objektiven eine Bildfeldebnung ergeben [18]. Ihnen kam besondere Bedeutung zu, solange es keine Planapochromate gab. Die Homale waren in erster Linie für mikrofotografische Aufnahmen mit großformatigen Balgenkameras (9×12, 13×18) bestimmt. Obwohl die Homale okularähnlich gefaßt sind, passen sie nicht in normale Tuben, sondern erfordern einen besonderen Tubusanschluß. Da die Apochromate unterschiedliche Bildfeldkrümmung haben, wurden zwecks optimaler Korrektion drei Homale gefertigt: Homal II mit Brennweite −70 mm und Feldzahl 15 mm; Homal VI mit Brennweite −37,5 mm und Feldzahl 14 mm; Homal IV mit Brennweite −20 mm und Feldzahl 8 mm.

Quarzokulare, UV-Projektive, Spiegelprojektive

Die Quarzokulare sind für die UV-Mikrofotografie entwickelt worden und zur Verwendung mit den Quarz-Monochromaten vorgesehen. Mit den heute üblichen Bezeichnungen muß man sie unter die Projektive einordnen. Sie sind für eine mittlere Kameralänge von 30 cm berechnet. Die schwächeren sind nach dem Huygensschen Typ, die stärkeren nach dem Ramsdenschen Typ gebaut. Früher wurden sechs Quarzokulare hergestellt, später das Sortiment auf drei eingeschränkt: Quarzokular 5 mit $f_{275\,\mathrm{nm}} = 36$ mm und Feldzahl 16 mm; Quarzokular 10 mit $f_{275\,\mathrm{nm}} = 18$ mm und Feldzahl 11 mm; Quarzokular 20 mit $f_{275\,\mathrm{nm}} = 9$ mm und Feldzahl 6 mm. Seit der Einstellung der Fertigung der Quarz-Monochromate zugunsten geeigneterer UV-Objektive werden auch keine Quarzokulare mehr hergestellt. Statt dessen wurde ein vollkommen achromatisches Spiegelprojektiv entwickelt.
Die Firma Opton stellt drei UV-Projektive her: K 3,2:1; K 10:1 und 100:1, wobei letzteres nur für fotometrische Messungen vorgesehen ist.
Das von *Riesenberg* entwickelte Spiegelprojektiv [41] besteht aus zwei außeraxial angeordneten Spiegeln, die in Verbindung mit einem Quarzkeil eine farbfreie Abbildung eines relativ großen Felds über das sichtbare und ultraviolette Spektrum gestatten. Es wurde für die UV-Mikroskopie ausgeführt mit der Feldzahl 12 mm, dem Abbildungsmaßstab 6,3:1 und für eine Objekt-Bild-Entfernung von etwa 200 mm. In der Spektroskopie haben die Spiegelprojektive in Verbindung mit Bildwandlern Bedeutung für Spektralmeßgeräte.

2.7. Kondensoren

In mikroskopischen Beleuchtungseinrichtungen ist der Kondensor das optische System, das in der Nähe des mikroskopischen Präparats angeordnet ist und zur Erzeugung eines beleuchteten Objektfelds mit einer der numerischen Apertur der Objektive angepaßten Beleuchtungsapertur dient. Die Beleuchtung erfolgt nach dem Köhlerschen Prinzip (s. Bild 2.13).
Die Durchlicht-Beleuchtungsanordnungen werden meist so ausgeführt, daß die Lampe, der Kollektor und die Leuchtfeldblende im Fuß des Stativs eingebaut sind, während der Kondensor eine Baueinheit für sich bildet, die an das Mikroskop ansetzbar und austauschbar ist. Bei Auflicht-Beleuchtungseinrichtungen wirkt im Fall des Auflicht-Hellfelds das Objektiv als sein eigener Kondensor, im Fall des Auflicht-Dunkelfelds ist das Objektiv von einem Dunkelfeldkondensor ringförmig umgeben (s. Objektive für Dunkelfeld Abschn. 2.5.4.).
Bei der Durchlichtbeleuchtung ist zweckmäßig zu unterscheiden zwischen Hellfeldkondensoren, Dunkelfeldkondensoren und Spezialkondensoren für besondere Anwendungen.

Hellfeldkondensoren

Unterschiedliche Hellfeldkondensoren sind aus verschiedenen Gründen erforderlich. Obwohl eine Beleuchtungsanordnung nach dem Köhlerschen Prinzip eine Regelung der Beleuchtungsapertur und der Größe des beleuchteten Objektfelds erlaubt, ist es nicht möglich, mit dem gleichen Kondensor die erheblich voneinander abweichenden Objektfeldgrößen der schwächsten und stärksten Mikroskopobjektive auszuleuchten und zur Anpassung an die numerischen Aperturen der Objektive geringste und höchste Beleuchtungsaperturen zu erzielen. Wenn man davon ausgeht, daß die Beleuchtungsapertur im Grenzfall so groß wie die numerische Apertur des Mikroskops sein soll, so müßte die Beleuchtungsapertur des Kondensors gleich der höchsten vorkommenden numerischen Apertur der Objektive sein, d.h., $A \approx 1{,}4$. Ein solcher Kondensor muß immergiert verwendet werden. Er hat eine geringe Brennweite und bildet deshalb die Leuchtfeldblende

relativ klein in die Objektebene ab. Eine Ausleuchtung der abgebildeten Objektfelder schwacher Mikroskopobjektive ist dadurch nicht möglich.
Es gibt mehrere Wege, den Übergang zu größeren Objektfeldern zu erreichen. Die erste Möglichkeit besteht darin, den mehrgliedrigen Kondensor als Satzkondensor auszubilden und die in Schraubfassungen gefaßten Frontlinsen oder Gruppen von Linsen durch Abschrauben aus dem Strahlengang zu entfernen oder durch andere zu ersetzen, wodurch der übrigbleibende Kondensorteil eine größere Brennweite erhält und die Beleuchtungsapertur verringert wird. Dieses Verfahren wird heute kaum noch angewendet, weil es zeitraubend und umständlich ist. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die Frontlinse oder mehrere Linsen aus dem Strahlengang auszuklappen (Klappkondensor). Nach einer derartigen Änderung muß der Kondensor nachfokussiert werden, um wieder eine scharfe Abbildung der Leuchtfeldblende in die Objektebene zu erhalten. In beiden Fällen kommt noch der Nachteil hinzu, daß sich bei den beschriebenen Änderungen die Lage des vorderen Brennpunkts mit ändert, so daß die fest angeordnete Aperturblende nicht mehr in der günstigsten Lage steht. Eine besondere Form eines Klappkondensors ist der Zweiblendenkondensor nach *Berek*, der außer der Aperturblende auch die Leuchtfeldblende enthält, die beim Ausklappen des Frontteils die Funktion der Aperturblende übernimmt. Eine Regelung des Leuchtfelds ist jedoch dann nicht mehr gegeben. Die dritte Möglichkeit ergibt sich durch Einschalten einer Großfeldlinse oder eines Großfeldsystems unterhalb des Kondensors, wodurch größere Objektfelder ausgeleuchtet werden und sich die Beleuchtungsapertur verringert. Im Fall der eingeschalteten Großfeldlinse wird auf die Abbildung einer Leuchtfeldblende in die Objektebene verzichtet und vom Köhlerschen Prinzip abgewichen. Durch bestimmte Wahl der Großfeldlinse und eine weitere Blende kann auch beim Übergang zu großen Feldern und kleinen Aperturen das Köhlersche Prinzip eingehalten werden. Schließlich ist ein kontinuierlicher Übergang zwischen kleinen Objektfeldern und großen Aperturen zu großen Objektfeldern und kleinen Aperturen durch ein optisches System veränderlicher Brennweite möglich, das unterhalb eines feststehenden Kondensors angeordnet ist (pankratischer Kondensor).
Auf den Kondensoren wird die höchste erreichbare Beleuchtungsapertur aufgraviert. Außer Kondensoren mit $A = 1{,}4$ werden solche gebaut,

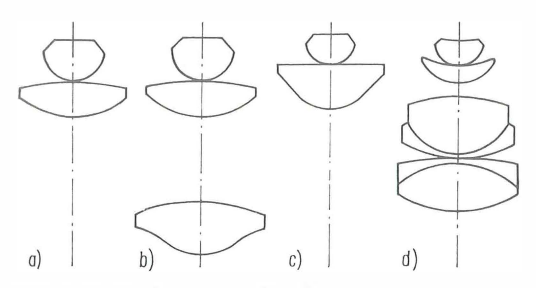


Bild 2.55. Bauformen von Kondensoren
a) Kondensor 1,2;
b) Kondensor 1,2 mit Großfeldlinse;
c) aplanatischer Kondensor 1,4;
d) achromatisch-aplanatischer Kondensor 1,4

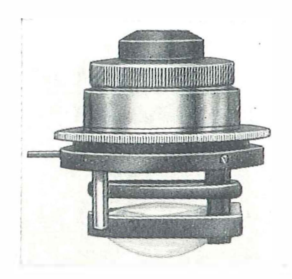


Bild 2.56. Kondensor 1,2 mit ausklappbarer Großfeldlinse
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

die von vornherein eine kleinere Apertur haben, da in den seltensten Fällen die Beleuchtungsapertur ebenso groß gewählt wird wie die numerische Apertur der Objektive. Für den praktischen Gebrauch in der üblichen Mikroskopie gilt die Faustregel, daß die Beleuchtungsapertur etwa zwei Drittel der numerischen Apertur des Objektivs betragen soll. Dann kann man gute Auflösung bei gutem Kontrast erwarten. Zu große Beleuchtungsapertur mindert den Kontrast. In den meisten Fällen ist demnach ein Trockenkondensor mit der Apertur $A = 0{,}9$ auch für Immersionsobjektive ausreichend.
Im folgenden werden anhand einiger Kondensoren des VEB Carl Zeiss JENA die Kondensorformen und ihre Anwendungen erläutert.
Sehr verbreitet ist der zweilinsige Kondensor 1,2 (Bild 2.55a) der mit Immersionsöl zwischen Frontlinse und Objektträger die Apertur von $\approx 1{,}2$ und ohne Immersionsöl $\approx 0{,}8$ hat. Dieser Kondensor ist weder aplanatisch noch achromatisch. Die Linsen haben hinsichtlich des Öffnungsfehlers die günstigste Form; bei dem einfachen Aufbau bleibt jedoch aufgrund der großen Apertur ein erheblicher Öffnungsfehler bestehen. Die Front-

linse ist (bei einigen Ausführungen) abschraubbar, jedoch wird er seit einiger Zeit mit ausklappbarer Großfeldlinse geliefert (s. Bilder 2.55b und 2.56), so daß auf das umständliche Abschrauben verzichtet werden kann. Mit dem Kondensor 1,2 kann das Köhlersche Prinzip insofern nur annähernd erfüllt werden, als die Abbildung der Leuchtfeldblende in die Objektebene unscharf und farbig erfolgt. Um Farbeffekte zu vermeiden, muß man ein größeres Objektfeld ausleuchten, als bei scharfer und farbfreier Abbildung der Leuchtfeldblende erforderlich wäre. Trotz dieser Mängel ist der einfache Kondensor 1,2 für viele mikroskopische Untersuchungen ausreichend.

Eine höhere Abbildungsgüte hat der aplanatische Kondensor 1,4 (Bild 2.55c), der ebenfalls zweilinsig aufgebaut ist, jedoch zwecks Korrektion des Öffnungsfehlers eine asphärische Fläche enthält. Er wird dann angewendet, wenn die Anforderungen an die Abbildungsqualität des Kondensors höher sind, als sie der Kondensor 1,2 zu leisten vermag, und die farbige Abbildung der Leuchtfeldblende nicht stört. Aufgrund der schärferen Abbildung der Leuchtfeldblende ist die Realisierung des Köhlerschen Beleuchtungsprinzips besser möglich, was bei verschiedenen mikroskopischen Untersuchungen und bei der Schwarzweißmikrofotografie mit Grünfilterlicht zweckmäßig ist. Die Aplanasie des Kondensors ist auch in der Fluoreszenzmikroskopie von Vorteil.

Dem Korrektionszustand eines achromatischen Objektivs nähert sich der achromatisch-aplanatische Kondensor 1,4, der auch in seinem Aufbau einem Achromaten ähnelt (s. Bild 2.55d). Er wird überall dort verwendet, wo gesteigerte Forderungen hinsichtlich der Farbwiedergabe gestellt werden, z.B. bei manchen Untersuchungen im weißen Licht, besonders bei der farbigen Mikrofotografie.

Zur Ausleuchtung der großen Objektfelder der lupenfotografischen Objektive M wird ein Brillenglaskondensor verwendet. Mit ihm bildet man die Leuchtfeldblende zweckmäßig in die Eintrittspupille der lupenfotografischen Objektive ab, so daß sie als Aperturblende wirkt.

Wenn feststeht, daß mit einem Mikroskop ohne Immersionsobjektive gearbeitet wird oder daß zur Ausleuchtung eine bestimmte Apertur genügt, ist es sinnvoll, Kondensoren zu verwenden, deren Apertur der Objektivbestückung angepaßt ist. So gibt es Kondensoren mit verschiedenen Maximalaperturen (z.B. 0,5; 0,6 mit Großfeldoptik, dabei Einhaltung des Köhlerschen Prinzips; 0,9).

Dunkelfeldkondensoren

Dunkelfeldkondensoren haben eine Zentralabschattung von erheblicher Größe. Ihre innere Apertur muß größer sein als die Beobachtungsapertur des Objektivs, damit kein direktes Licht in das Objektiv gelangt. Man kann die Zentralabschattung durch Einlegen von Zentralblenden in normale Hellfeldkondensoren erreichen. Die speziell für Dunkelfeldbeleuchtung entwickelten Kondensoren sind Spiegelkondensoren besonderer Art, die im Prinzip Zweispiegelsysteme mit einem konvexen und einem konkaven Spiegel sind (Bild 2.57 und 2.58). Die spiegelnden Flächen sind an Glaskörpern angeschliffen, so daß die Strahlen innerhalb des Kondensors im Glas verlaufen und an den wirksamen Flächen ent-

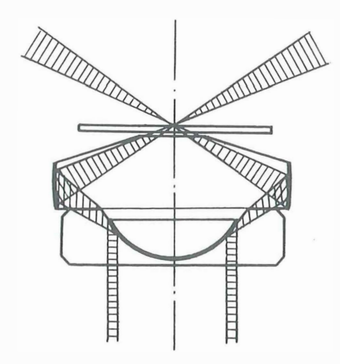


Bild 2.57. Strahlengang im Kardioidkondensor

Das zentrale, nicht gezeichnete Strahlenbündel wird zurückgeworfen

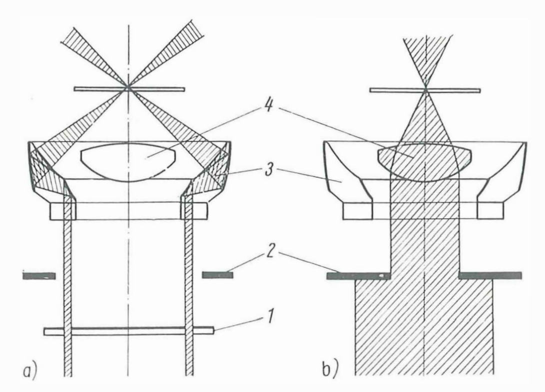


Bild 2.58. Strahlengang im Präparier-Wechselkondensor für Dunkelfeldbeleuchtung a) und Hellfeldbeleuchtung b)

1 Ringblende; *2* Irisblende; *3* Dunkelfeld-Trockenkondensor (innere numerische Apertur 0,7, äußere numerische Apertur 0,9), Schnittweite 11 mm; *4* Hellfeldkondensor

weder totalreflektiert oder an verspiegelten Flächen reflektiert werden. Die Eintritts- und Austrittsflächen sind so gestaltet, daß die Strahlen ungebrochen hindurchgehen.
Der Dunkelfeldkondensor für Immersion wird als Kardioidkondensor (Bild 2.57) bezeichnet. Seine innere numerische Apertur beträgt 1,05. Die Bezeichnung rührt daher, daß die Meridiankurve des konkaven Spiegels bei exakt aplanatischer Abbildung eine Kardioide ist. Bei der praktischen Ausführung wird die Kardioidfläche durch eine Kugelfläche ersetzt, wobei die aplanatische Abbildung weitgehend erhalten bleibt. Die in Verbindung mit dem Kardioidkondensor benutzten Objektive sind meist auch Immersionsobjektive, die mit einer Irisblende ausgestattet sein müssen, damit ihre numerische Apertur kleiner als die innere Apertur des Kardioidkondensors gemacht werden kann.
Dunkelfeldkondensoren mit kleineren Aperturen für Trockensysteme werden Präparier-Dunkelfeldkondensoren genannt. Nutzt man den zentralen Teil für eine Durchlichtbeleuchtung mit einem zentral angeordneten Linsenkondensor aus, so spricht man von einem Präparier-Wechselkondensor (Bild 2.58).

3. Beugungstheorie der mikroskopischen Abbildung

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

Die Erfinder des Mikroskops haben die brechende Wirkung des Glases, aber nicht das von *Snellius* 1615 entdeckte Brechungsgesetz gekannt. Sie konnten also die optische Wirkung ihrer Linsen nicht im voraus bestimmen und waren deshalb auf das Probieren angewiesen. In den darauffolgenden Jahren lernte man die Gesetze der geometrischen Optik immer besser zu verstehen und anzuwenden, doch ist es letzten Endes bei der Fertigung der Mikroskopoptik bis zur Mitte des 19. Jahrhunderts immer noch beim Experimentieren geblieben. Es bestand die These, daß man nur genügend vergrößern müsse, um beliebig feine Einzelheiten erkennen zu können. Diese Annahme ist mit der geometrischen Optik allein nicht zu widerlegen. Einer der entscheidenden Wegbereiter der modernen Mikroskopie war *Ernst Abbe*, der zunächst auf Anregung von *Carl Zeiss* die Fertigung der Mikroskopoptik auf eine wissenschaftliche Grundlage stellte, d.h. die optische Wirkung exakt im voraus berechnete, und nach seinen Berechnungen die optischen Teile fertigen und montieren ließ.
In seiner „Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop“ [50] erkannte er die Beugung des Lichts als wesentlich für die mikroskopische Abbildung und leitete daraus Möglichkeiten und Grenzen der Lichtmikroskopie ab. Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß nicht die Vergrößerung, sondern die Auflösung das entscheidende Kriterium für die Leistungsfähigkeit des Mikroskops ist.

3.1. Kohärenz des Lichts

Vorbedingung für die Entstehung der Interferenz- und Beugungserscheinungen, die die Grundlage für die mikroskopische Abbildung darstellen, ist die Kohärenz des Lichts.
Zum Erzeugen sichtbarer Interferenzen müssen mindestens Teile zweier Wellenzüge gleicher Frequenz gleichzeitig denselben Bereich passieren. Ist das der Fall, dann nennt man die beiden Wellenzüge zueinander kohärent. Die Forderung nach Gleichzeitigkeit klingt fast trivial, ist aber wesentlich für die Entstehung der Lichtinterferenzen und begründet die Aussage, daß Interferenzerscheinungen nur zu erwarten sind, wenn das gleichzeitig einen Raumpunkt passierende Licht vom gleichen Punkt der gleichen Lichtquelle ausgegangen ist.

3.2. Interferenz und Beugung [64]

3.2.1. Licht als Wellenbewegung

Unter Licht im engeren Sinne versteht man den Teil der elektromagnetischen Wellenstrahlung, den das menschliche Auge als Helligkeit oder Farbe empfindet. Die Wellenstrahlung läßt sich durch vier wesentliche Größen beschreiben: Frequenz, Wellenlänge, Geschwindigkeit und Amplitude. Die Frequenz ν ist die Anzahl der Schwingungen je Sekunde und kennzeichnet die Farbe des Lichts. Die Wellenlänge λ ist der räumliche Abstand zweier Wellenberge. Die Amplitude a ist die Schwingungsweite; ihr Quadrat ist der Intensität proportional und damit ein Maß für die Helligkeit. Die Wellenlänge ist, auf das gleiche Medium bezogen, der Frequenz umgekehrt proportional, so daß ihr Produkt konstant und gleich der Lichtgeschwindigkeit c ist. Es bestehen also die Beziehungen

$$\nu\lambda = c \quad \text{bzw.} \quad \nu = \frac{c}{\lambda}.$$

Im Vakuum ist $c = c_0$ für alle Frequenzen gleich, etwa $3 \cdot 10^{10}$ cm/s, so daß die Farbe auch durch die Lichtwellenlänge im Vakuum charakterisiert werden kann. In jedem Medium (auch in Luft) ist die Lichtgeschwindigkeit kleiner. Das Verhältnis der Lichtgeschwindigkeit in Vakuum und Medium $c_0/c = n$ wird als die Brechzahl des Lichts für das

entsprechende Medium bezeichnet. Sie ist stets größer als Eins und von der Art des Mediums und der Wellenlänge abhängig. Diese Abhängigkeit von der Wellenlänge wird als Dispersion bezeichnet.
Für die mathematische Behandlung ist es vorteilhaft und ausreichend, nur sinusförmige Wellenzüge zu betrachten. Im Bild 3.1. ist ein rotierender Zeiger der Länge a_0 als winkelabhängige Komponente dargestellt. Zu jedem Drehwinkel φ wird die Strecke $a = a_0 \sin \varphi$ aufgetragen, so daß ihre Endpunkte die gesuchte Sinuslinie ergeben.

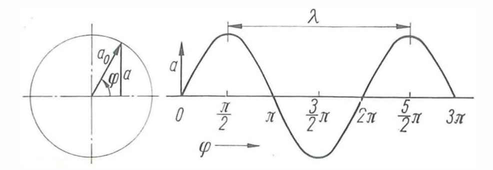


Bild 3.1. Darstellung einer Sinuswelle

Bei einer Welle wird diese Schwingung von Ort zu Ort übertragen. Es muß also in dem Ausdruck für den Phasenwinkel φ ein vom Ort abhängiges Glied eingeführt werden. Man setzt $\varphi = \omega\,(t - x/v)$ und erhält

$$a = a_0 \sin \omega\,(t - x/v). \tag{3.1}$$

Dabei ist x die Ortskoordinate in Fortpflanzungsrichtung, v die Phasengeschwindigkeit. Der zeitliche und örtliche Verlauf der Schwingung kann durch einen mit konstanter Geschwindigkeit rotierenden Zeiger dargestellt werden, so daß der Schwingungszustand an einem bestimmten Ort und zu einer bestimmten Zeit eindeutig durch Richtung und Länge dieses Zeigers bestimmt ist. Der Abstand zweier benachbarter Maxima, der einer vollen Umdrehung des Zeigers entspricht, ist die Wellenlänge λ, und die Fortpflanzungsgeschwindigkeit eines Wellenberges ist die Phasengeschwindigkeit v oder, auf das Licht bezogen, die Lichtgeschwindigkeit c.

3.2.2. Grundprinzipien der Interferenz

Die Zeigerdarstellung im Bild 3.1 ist sehr gut geeignet, um quantitative Aussagen über die resultierende Wirkung zweier oder mehrerer miteinander interferierender Lichtwellen zu erhalten. Im Bild 3.2 wird die Darstellung für zwei Wellen gezeigt. Im Bild 3.2a sollen beide Wellen in Phase sein, d.h., die beiden mit gleicher Geschwindigkeit rotierenden Zeiger a_1 und a_2 haben stets gleiche Richtung. Als resultierende Amplitude ergibt sich

$$a_R = a_1 + a_2 \tag{3.2a}$$

und als Intensität

$$a_R^2 = a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2. \tag{3.2b}$$

Im Bild 3.2b sollen beide Wellen um 180° phasenverschoben sein, d.h., die beiden Zeiger haben stets entgegengesetzte Richtung. Als resultierende Amplitude erhält man

$$a_R = a_1 - a_2 \tag{3.2c}$$

und als Intensität

$$a_R^2 = a_1^2 + a_2^2 - 2a_1a_2. \tag{3.2d}$$

Bei gleichen Amplituden $a_2 = a_1$ wird im Fall Bild 3.2a

$$a_R = 2a_1; \quad a_R^2 = 4a_1^2,$$

im Fall Bild 3.2b

$$a_R = 0; \quad a_R^2 = 0.$$

Der Fall beliebiger Amplituden und beliebiger Phasendifferenz wird im Bild 3.2c gezeigt. Die resultierende Amplitude ergibt sich durch geometrische Addition der Einzelamplituden unter Berücksichtigung der Phasendifferenz $\Delta\varphi$. Rechnerisch bestimmt man zunächst die resultierende Intensität

$$a_R^2 = a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2 \cos \Delta\varphi \tag{3.2e}$$

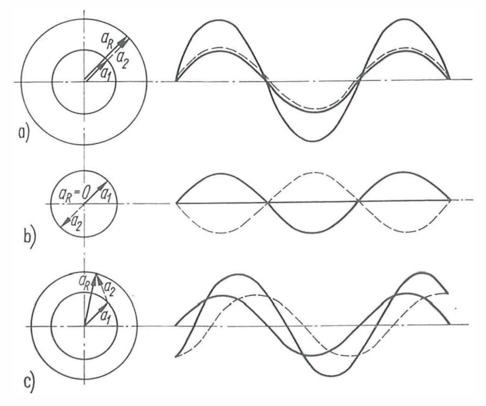


Bild 3.2. Interferenz zweier Wellen gleicher Wellenlänge

a) gleiche Amplitude und gleiche Phase, maximale Verstärkung;
b) gleiche Amplitude und Phasendifferenz von 180°, Auslöschung;
c) beliebige Amplitude und beliebige Phasendifferenz

und daraus die resultierende Amplitude

$$a_R = \sqrt{a_1^2 + a_2^2 + 2a_1a_2 \cos \Delta\varphi}.$$

Nach Abschn. 3.1. können Lichtinterferenzen nur durch Aufspaltung des von der gleichen Lichtquelle ausgegangenen Lichts erzeugt werden. Dies kann durch Ausblenden einzelner eng benachbarter Winkelbereiche oder besser durch Strahlenteilung geschehen, hervorgerufen durch eine halbdurchlässige Teilungsfläche oder Beugung des Lichts. Besonders anschaulich läßt sich die Entstehung von Interferenzstreifen durch einen von zwei Glasplatten a) und b) gebildeten Luftkeil, wie im Bild 3.3 gezeigt wird, darstellen.

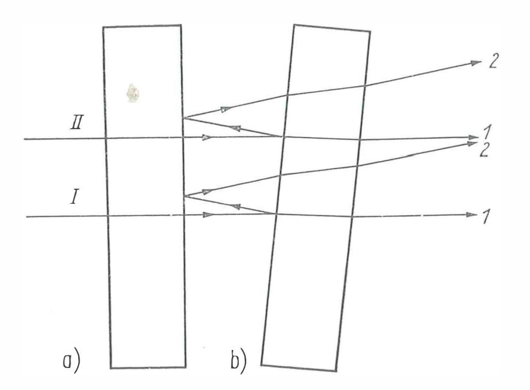


Bild 3.3. Interferenzen am Luftkeil

Zwei Strahlen *I* und *II* fallen von links ein. An jeder Glas-Luft-Fläche tritt eine Aufspaltung in den hindurchgelassenen und den reflektierten Anteil auf. Wir wollen nur die Aufspaltung an der Fläche *b* berücksichtigen. Dicke und Winkel des Luftkeils sind im Bild 3.3 der Deutlichkeit halber übertrieben groß gezeichnet. Jeder ankommende Strahl wird bei *b* in zwei Strahlen *1* und *2* aufgespaltet, die einen Gangunterschied erhalten, der etwa der doppelten an der durchstrahlten Stelle vorhandenen Keildicke entspricht. Die Teilstrahlen *1* und *2* interferieren miteinander, nachdem sie durch das Auge oder das Objektiv einer fotografischen Einrichtung vereinigt worden sind. Die beiden Strahlen schwächen oder verstärken sich, je nachdem, ob der Gangunterschied ein ungerad- oder ein geradzahliges Vielfaches von $\lambda/2$ ist. Da sich der Gangunterschied in Abhängigkeit von der Keildicke laufend ändert, sieht man abwechselnd helle und dunkle Interferenzstreifen dort, wo sich die rückwärtige Verlängerung des Strahls *2* mit der des Strahls *1* schneidet. Bei Beobachtung im weißen Licht sieht man die Streifen nur bei sehr geringen Keildicken und farbig, weil die Auslöschung bzw. Schwächung nur für einen Teil des sichtbaren Spektrums erfolgt. Ein Beispiel ist der farbig schimmernde Ölfleck auf nassem Asphalt.

3.2.3. Beugung

Die Beurteilung der Leistungsfähigkeit eines Mikroskops ist ohne Berücksichtigung der Beugung nicht möglich. Zunächst seien einige leicht zu übersehende Tatsachen dargestellt.

Fällt ein paralleles Lichtbündel auf eine relativ zur Lichtwellenlänge große Öffnung, so erwartet man auf einem in nicht zu großer Entfernung aufgestellten Schirm einen Lichtfleck, dessen Umrandung der aus dieser Öffnungresultierendengeometrischen Schattengrenze entspricht (Bild 3.4). Je kleiner die Öffnung ist, um so mehr Licht tritt über die geometrische Schattengrenze hinaus. Das Licht wird an der kleinen Öffnung gebeugt. Ist die beugende Öffnung kreisförmig und sehr klein, und vereinigt man das von ihr ausgehende Licht in der Brennebene einer Sammellinse, so besteht die dort entstehende Beugungsfigur aus einem zentralen hellen Fleck, der von nach außen mehr und mehr verblassenden Kreisringen umgeben ist (Bild 3.5). Den zentralen Fleck, bzw. das erzeugende Lichtbündel, bezeichnet man als die 0., die anschließenden hellen Ringe als die 1., 2., 3., usw. Beugungsordnung.

Zur Erklärung dieser Erscheinungen wendet man

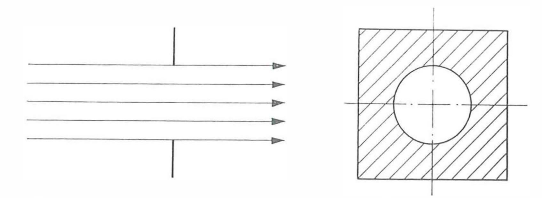


Bild 3.4. Das durch eine relativ große Öffnung begrenzte Lichtbündel bildet auf einem Schirm einen Lichtfleck, der der geometrischen Schattengrenze entspricht

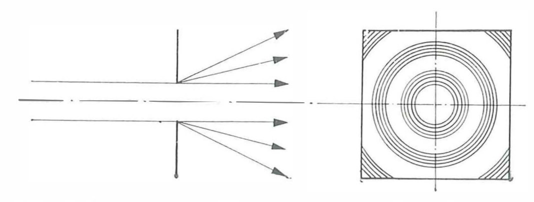


Bild 3.5. Schema der Beugung an einer kreisförmigen Öffnung

das Huygenssche Prinzip zunächst auf einen engen und langen Spalt an (eindimensionales Objekt). Jeder Raumpunkt, der vom Licht getroffen wird, kann als Ursprung einer Kugelwelle angesehen werden. Man betrachte den im Bild 3.6 stark vergröbert gezeichneten Schnitt durch einen Spalt, der von kohärentem Licht beleuchtet wird. Der Einfachheit halber wird eine ebene Welle angenommen, die in einem Schnitt senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung in allen Punkten die gleiche Phase hat. Die im Spalt markierten sechs Punkte haben unter den angenommenen Voraussetzungen stets die gleiche Phase. Man sucht solche Richtungen auf, in denen sich die einzelnen Strahlen nach Vereinigung in der Brennebene einer Linse maximal verstärken oder schwächen. Dabei sind jeweils die Phasendifferenzen in einem

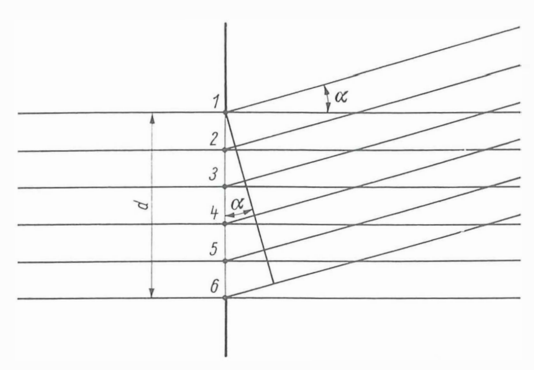


Bild 3.6. Schema der Beugung am Spalt

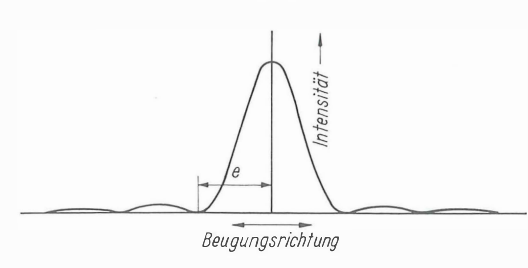


Bild 3.7. Qualitative Intensitätsverteilung bei der Beugung am Spalt

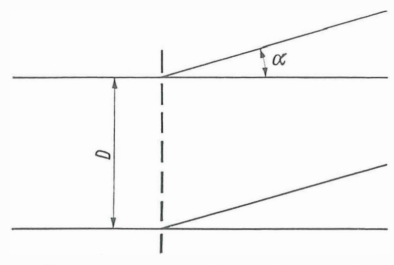


Bild 3.8. Qualitative Behandlung der Beugung am Gitter

Schnitt senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung zu betrachten. Man sieht sofort, daß sich die Strahlen 0. Ordnung gegenseitig verstärken, da sie alle gleiche Phase haben. Dunkelheit tritt erstmals für den Winkel α auf, bei dem der Gangunterschied zwischen erstem und sechstem Strahl, $\Delta = d \sin \alpha$, eine Wellenlänge beträgt. Denn teilt man den Spalt in zwei Hälften, so findet sich zu jedem Strahl in der ersten einer in der zweiten Hälfte mit dem Gangunterschied von $\lambda/2$, so daß sich alle Strahlen gegenseitig auslöschen. Die gleiche Wirkung tritt auf, wenn dieser Gangunterschied das Doppelte, Dreifache, Vierfache usw. einer Wellenlänge beträgt, also für alle Winkel α, für die gilt

$$\Delta = d \sin \alpha = \nu\lambda \tag{3.3a}$$

mit

$$\nu = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \ldots$$

Zwischen diesen Minima gibt es, außer dem Maximum für $\Delta = 0$, Maxima, die bei

$$\Delta = d \sin \alpha = (2\nu + 1)\, \lambda/2 \tag{3.3b}$$

mit

$$\nu = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \ldots,$$

d.h. in den Richtungen liegen, für die Δ ein ungeradzahliges Vielfaches von $\lambda/2$ ist.

Der qualitative Intensitätsverlauf bei der Beugung am Spalt ist im Bild 3.7 dargestellt worden.

Nunmehr soll die Beugung an einem Gitter behandelt werden (Bild 3.8). Da es aus sehr vielen äquidistanten Spalten besteht, gilt zunächst für die Richtungsabhängigkeit der Intensität das gleiche wie beim Einzelspalt. Da aber sehr viele Spalte zusammenwirken, treten weitere Minima für die Richtungen auf, in denen die vom ersten und vom letzten beleuchteten Spalt ausgehenden Strahlen einen Gangunterschied von

$$\Delta = D \sin \alpha = \mu\lambda \tag{3.4a}$$

haben. D ist der Abstand zwischen erstem und letztem Spalt. Ausnahmen bilden die Richtungen, in denen zwischen benachbarten Gitterstrichen der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches von λ beträgt. In diesem Fall ist $\mu = \nu N$ und

$$D \sin \alpha = \nu N \lambda$$

$$D/N = b = \nu\lambda/\sin \alpha. \tag{3.4b}$$

N bedeutet die Anzahl der Gitterspalte, ν die Beugungsordnung und b die Gitterkonstante, d.h. der Abstand benachbarter Spalte. Dann sind alle von den einzelnen Spalten herrührenden Strahlen in Phase, und wir erhalten im Rahmen der durch

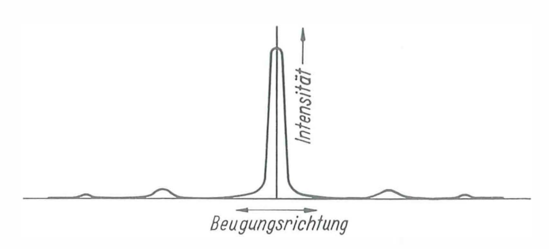


Bild 3.9. Qualitative Intensitätsverteilung bei der Beugung am Gitter

den Einzelspalt festgelegten Intensitätsverteilung maximale Verstärkung, also ein Hauptmaximum. Die zwischen diesen Hauptmaxima auftretenden Minima werden um so zahlreicher, je mehr Spalte mitwirken, und führen schließlich zu einer Intensitätsverteilung, wie sie im Bild 3.9 vereinfacht angedeutet ist. In der Brennebene einer Linse entstehen anstatt der relativ breiten und verwaschenen Beugungsstreifen des Einzelspalts relativ enge, scharfe Linien, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den im Spektroskop sichtbaren Spektrallinien haben. Man spricht deshalb auch vom Beugungsspektrum eines Gitters.

3.2.4. Anwendung der Beugung auf die mikroskopische Abbildung

Der Satz, daß sowohl dem Spalt als auch dem Gitter eine charakteristische Beugungsfigur in der Brennebene einer Linse entspricht, läßt sich auf beliebige beugende Objekte verallgemeinern, ist also auf die mikroskopische Abbildung beliebiger Objekte anwendbar. Bis auf geringe Ausnahmen ist dieser Satz auch umkehrbar, d.h., aus einer bekannten Beugungsfigur läßt sich auf die Gestalt des sie erzeugenden Objekts schließen, wenn alles am Objekt gebeugte Licht durch die Linse bzw. das Objektiv erfaßt wurde. Diese Erkenntnis führte *Abbe* dazu, die mikroskopische Abbildung eines beliebigen beleuchteten Objekts in zwei Schritte zu zerlegen:

1. Schritt

Das beleuchtete Objekt läßt in der hinteren Brennebene des Objektivs eine für das Objekt charakteristische Beugungsfigur entstehen.

2. Schritt

Das von dieser Beugungsfigur ausgehende Licht erzeugt in der Zwischenbildebene durch Interferenz ein Bild des Objekts.

Abbe nennt diese Beugungsfigur das primäre Zwischenbild, im Gegensatz zum nach dem zweiten Schritt entstehenden sekundären Zwischenbild, das mit dem Okular beobachtet wird. Die nochmalige Abbildung durch das Okular ist für die Theorie der mikroskopischen Abbildung von untergeordneter Bedeutung und soll in diesem Zusammenhang unberücksichtigt bleiben.

Aus der Abbeschen Betrachtung der mikroskopischen Abbildung beleuchteter Objekte ergeben sich folgende wichtige Konsequenzen:

Da eine eindeutige Zuordnung der ungestörten Beugungsfigur zum Zwischenbild besteht, kann das Bild durch einen Eingriff in die Beugungsfigur dem Objekt unähnlich gemacht werden. Das läßt sich am Beispiel der Gitterabbildung besonders deutlich zeigen und mit den von *Abbe* angegebenen Versuchen zur Bildentstehung im Mikroskop experimentell nachweisen. Aus Gl. (3.3a) ergibt sich der Zusammenhang zwischen Spaltbreite d und dem zu einem dunklen Beugungsstreifen gehörenden Beugungswinkel α:

$$d = \nu\lambda / \sin\alpha \tag{3.5a}$$

oder, wenn man den Abstand des ersten Minimums von der optischen Achse (Bild 3.7) mit e und die Objektivbrennweite mit f bezeichnet,

$$d = \nu\lambda f / e; \tag{3.5b}$$

d.h., je kleiner der Abstand e, um so breiter ist der Spalt. Sinngemäß gilt das auch für das Gitter; je kleiner der Abstand e zwischen dem 0. und dem 1. Maximum, um so gröber ist das Gitter. Durch Ausblenden der ungeraden Beugungsordnungen, d.h. Verdoppelung der Abstände zwischen den aufeinanderfolgenden Maxima, kann sogar ein doppelt so feines Gitter vorgetäuscht werden, als wirklich vorhanden ist. Im Abschn. 3.3 über die Abbeschen Versuche wird darauf noch einmal genauer eingegangen werden.

Zu einer objektgetreuen Abbildung ist die Erfassung alles am Objekt gebeugten Lichts notwendig, allerdings nicht hinreichend. Wegen des beschränkten Öffnungswinkels, unter dem das Licht in die Frontlinse des Objektivs eintreten kann, ist diese Bedingung natürlich nicht vollständig zu erfüllen; deshalb wird das mikroskopische Bild dem Objekt mehr oder weniger unähnlich sein. Als Grenzfall ist der zu betrachten, bei dem außer der 0. gerade noch die 1. Beugungsordnung ins Objektiv eintritt. Dann ist aus dem Abstand e auch der Abstand d, d.h. die Spaltbreite oder beim Gitter die Gitterkonstante des zugehörigen Gitters bestimmt, und aus der

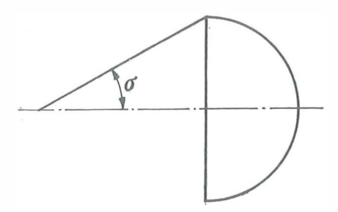


Bild 3.10. Definition der numerischen Apertur

Beugungsfigur kann noch durch Interferenz ein Bild entstehen, das die Spaltbreite bzw. die Gitterkonstante richtig wiedergibt. Es sind demnach die einzelnen Gitterstriche noch zu erkennen; man sagt, das Gitter ist aufgelöst. Gelangt jedoch nur die 0. Beugungsordnung in das Objektiv, dann können im Bild keine Strukturen mehr wahrgenommen werden. Wird der Öffnungswinkel des Objektivs mit σ bezeichnet (Bild 3.10), dann gilt für die Auflösungsgrenze des Gitters $\alpha = \sigma$, $\sin\alpha = \sin\sigma$ und nach Gl. (3.4b) für $\nu = 1$ (1. Beugungsordnung)

$$b_{\text{Gr}} = \lambda/\sin\sigma,$$

wenn sich zwischen Präparat und Objektivfrontlinse Luft befindet. Ist dieser Raum mit einem Medium der Brechzahl n ausgefüllt, dann verkleinert sich die Wellenlänge um den Faktor $1/n$, und es gilt

$$b_{\text{Gr}} = \lambda/n\,\sin\sigma.$$

Im Abschn. 2. wurde $n \sin\sigma$ als numerische Apertur A definiert. Damit ergibt sich für die Auflösungsgrenze bei Beleuchtung parallel zur optischen Achse

$$b_{\text{Gr}} = \lambda/A_{\text{Obj}}. \tag{3.6a}$$

Die Auflösungsgrenze ist primär unabhängig von der Spaltbreite. Bei beliebig engen Gitterspalten fällt lediglich die durch die Beugung am Spalt hervorgerufene Verkleinerung der Maxima höherer Ordnung weg, und alle Hauptmaxima haben nahezu die gleiche Höhe (Bilder 3.7 und 3.9). Läßt man das beleuchtende Bündel unter dem Winkel σ auf das Gitter einfallen (schiefe Beleuchtung), so kann der Abstand zwischen 0. und 1. Maximum doppelt so groß sein, um noch vom Objektiv aufgenommen zu werden, und man erhält in diesem Fall für die Auflösungsgrenze statt Gl. (3.6a)

$$b_{\text{Gr}} = \lambda/2A_{\text{Obj}}. \tag{3.6b}$$

Die größte Neigung der zur Beleuchtung dienenden Lichtbündel hängt von der durch den Kondensor gelieferten Beleuchtungsapertur ab. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ergibt sich für die Auflösungsgrenze eines Gitters

$$b_{\text{Gr}} = \frac{\lambda}{A_{\text{Obj}} + A_{\text{Bel}}}, \quad A_{\text{Bel}} \leqq A_{\text{Obj}}.$$

Diese theoretische Auflösungsgrenze wird im allgemeinen nicht erreicht, da sie von den jeweiligen Kontrastverhältnissen und psychologischen Einflüssen abhängt. Man fügt deshalb noch einen unbestimmten Faktor a hinzu, setzt also

$$b_{\text{Gr}} = \frac{a\lambda}{A_{\text{Obj}} + A_{\text{Bel}}} \tag{3.6c}$$

und nimmt a im Mittel mit 2 an.

Als Auflösungsvermögen wird der reziproke Wert der Auflösungsgrenze bezeichnet. Aus der nach den Gln. (3.6a) und (3.6b) festgelegten Auflösungsgrenze leitet sich der Begriff der nützlichen oder auch förderlichen Vergrößerung ab. Man kommt zu ihm auf folgende Weise:

Damit das Auge zwei Bildpunkte deutlich getrennt sieht, ist nach *Abbe* ein Winkelabstand von 2 bis 4′ zu fordern, d.h., die im Zwischenbild aufgelösten Objekteinzelheiten müssen durch das Okular so stark vergrößert werden, daß sie dem Auge mindestens unter diesem Winkel erscheinen. Bezeichnet man die dazu erforderliche untere und obere Grenze der Gesamtvergrößerung des Mikroskops (die förderliche Vergrößerung) mit V_{u} bzw. V_{o}, so ergibt sich auf die deutliche Sehweite von 250 mm bezogen mit $V_{\text{Mikr}} = 250/f_{\text{Mikr}}$ (f_{Mikr} ist in mm einzusetzen) die Beziehung

$$b_{\text{Gr}}/f_{\text{Mikr}} = b_{\text{Gr}} V_{\text{u}}/250 = 2' = 5{,}8 \cdot 10^{-4} \text{ bzw.}$$
$$b_{\text{Gr}}/f_{\text{Mikr}} = b_{\text{Gr}} V_{\text{o}}/250 = 4' = 11{,}6 \cdot 10^{-4}$$
(b_{Gr} in mm).

Durch Einsetzen von Gl. (3.6b) in obige Gleichung wird daraus

$$\frac{\lambda}{500\,A_{\text{Obj}}} V_{\text{u}} = 5{,}8 \cdot 10^{-4},$$

$$V_{\text{u}} = \frac{5{,}8 \cdot 10^{-4}}{\lambda} 500\,A_{\text{Obj}},$$

$$\frac{\lambda}{500\,A_{\text{Obj}}} V_{\text{o}} = 11{,}6 \cdot 10^{-4},$$

$$V_{\text{o}} = \frac{11{,}6 \cdot 10^{-4}}{\lambda} 500\,A_{\text{Obj}}$$

und mit $\lambda = 5{,}5 \cdot 10^{-4}$ mm, der Schwerpunktwellenlänge des sichtbaren Spektrums,

$$V_{\text{u}} = 528\,A_{\text{Obj}}, \quad V_{\text{o}} = 1056\,A_{\text{Obj}}.$$

Da es keinen Sinn hat, einen genauen Wert anzugeben, rechnet man gerundet mit $V_u = 500\,A_{Obj}$ und $V_o = 1000\,A_{Obj}$, d.h., die Vergrößerung soll zweckmäßig zwischen dem 500- und 1000fachen der numerischen Apertur des Objektivs liegen. Bei einer schwächeren Vergrößerung wird die Leistung des Objektivs nicht ausgenutzt, und bei einer stärkeren werden keine zusätzlichen Struktureinzelheiten des zu untersuchenden Objekts sichtbar gemacht. Diese Regel kann nicht als ein strenges Verbot aufgefaßt werden; denn es gibt durchaus Fälle, wo aus verschiedenen Gründen eine schwächere oder eine stärkere Vergrößerung zweckmäßig ist, doch wird das Objektiv dann in einem Vergrößerungsbereich benutzt, für den es eigentlich nicht gedacht ist. Man darf deshalb einen bei schwächeren Vergrößerungen und entsprechend größerem Bildfeld auftretenden Randabfall in der Bildqualität bzw. eine bei stärkerer Vergrößerung auftretende Minderung des Kontrastes sowie Konturenunschärfen nicht als mangelnde Qualität des Objektivs ansehen.

Im Fall der stärkeren Vergrößerung spricht man auch von einer Übervergrößerung oder einer leeren Vergrößerung, weil gegenüber der förderlichen Vergrößerung keine zusätzlichen Einzelheiten mehr sichtbar gemacht werden und die vom Objektiv aufgelösten Objektstrukturen lediglich stärker vergrößert erscheinen.

Daraus leitet sich eine für die praktische Mikroskopie wichtige Tatsache ab: Der Durchmesser der Austrittspupille des Mikroskops ist der Objektivapertur direkt und der Vergrößerung umgekehrt proportional

$$D_{AP} = 2K\frac{A_{Obj}}{V_{Mikr}}.$$

K entspricht der deutlichen Sehweite von 250 mm. Für die Grenzen der förderlichen Vergrößerung erhält man mit $A_{Obj}/V_{Mikr} = 1/500$ bzw. $1/1000$

$$D_{AP\,u} = 1\text{ mm}, \quad D_{AP\,o} = 0{,}5\text{ mm}.$$

Bei Anwendung von Übervergrößerungen wird der Pupillendurchmesser entsprechend kleiner, woraus sich folgende Konsequenzen ergeben:

Erstens nimmt die Bildhelligkeit mit dem Quadrat des Pupillendurchmessers ab (s. Abschn. 6.1.1.3.), und zweitens wird bei zu kleiner Pupille die mikroskopische Beobachtung sehr empfindlich durch die sog. „Entoptischen Erscheinungen" gestört. Darunter ist folgendes zu verstehen:

Das menschliche Auge weist in dem Raum zwischen Augenlinse und Netzhaut feine, sich bewegende Inhomogenitäten auf, deren Größe beträchtlich unter 1 mm liegt. Hat das vom Auge aufgenommene, abbildende Strahlenbündel einen genügend großen Durchmesser (Dmr. > 0,5 mm), dann sind die durch die Inhomogenitäten des Auges hervorgerufenen Störungen nur gering. Bei der Anwendung von Übervergrößerungen wird aber der Bündeldurchmesser wesentlich kleiner. Dann wirft jede Inhomogenität einen Schatten auf die Netzhaut, der langsam durch das Bild wandert. Das Auftreten der entoptischen Erscheinungen ist von Beobachter zu Beobachter verschieden.

Zur Beseitigung der entoptischen Erscheinungen wurde von *Lau* [49] der Vorschlag gemacht, am Ort des Zwischenbilds eine Mattscheibe anzuordnen, die das Licht streut und so die Austrittspupille des Mikroskops künstlich vergrößert. Dazu muß die Struktur der Mattscheibe unsichtbar gemacht werden; deshalb läßt man sie rotieren. So kann auch noch bei starken Übervergrößerungen bequem beobachtet werden, wenn man das Okular durch ein schwach vergrößerndes Mikroskop ersetzt. Eine solche mikroskopische Anordnung ist unter der Bezeichnung „Doppelmikroskop" bekannt geworden.

Der Hauptnachteil des Doppelmikroskops besteht darin, daß durch das Zwischenschalten der Mattscheibe das Zusammenwirken von Objektiv und Okular gestört ist; denn eine optimale Korrektion ist, besonders bei den apochromatischen Objektiven, nur möglich, wenn man Objektiv und Okular als Einheit betrachtet, während die Mattscheibe in der Bildebene eine getrennte Korrektion von Objektiv und Okular erfordert.

3.3. Abbesche Versuche zur Bildentstehung im Mikroskop [30] [51]

Ein wesentlicher Gesichtspunkt der Abbeschen Theorie ist die eindeutige Zuordnung des mikroskopischen Objekts zur von ihm erzeugten, in der Austrittspupille des Mikroskops entstehenden Beugungsfigur.

Es konnte daraus abgeleitet werden, daß die Leistungsgrenze des Mikroskops durch die Objektivapertur und die Lichtwellenlänge festgelegt ist.

Zur experimentellen Stütze der zunächst rein theoretischen Erörterungen sind von *Abbe* die nach ihm benannten Versuche zur Bildentstehung im Mikroskop angegeben worden. Erforderlich

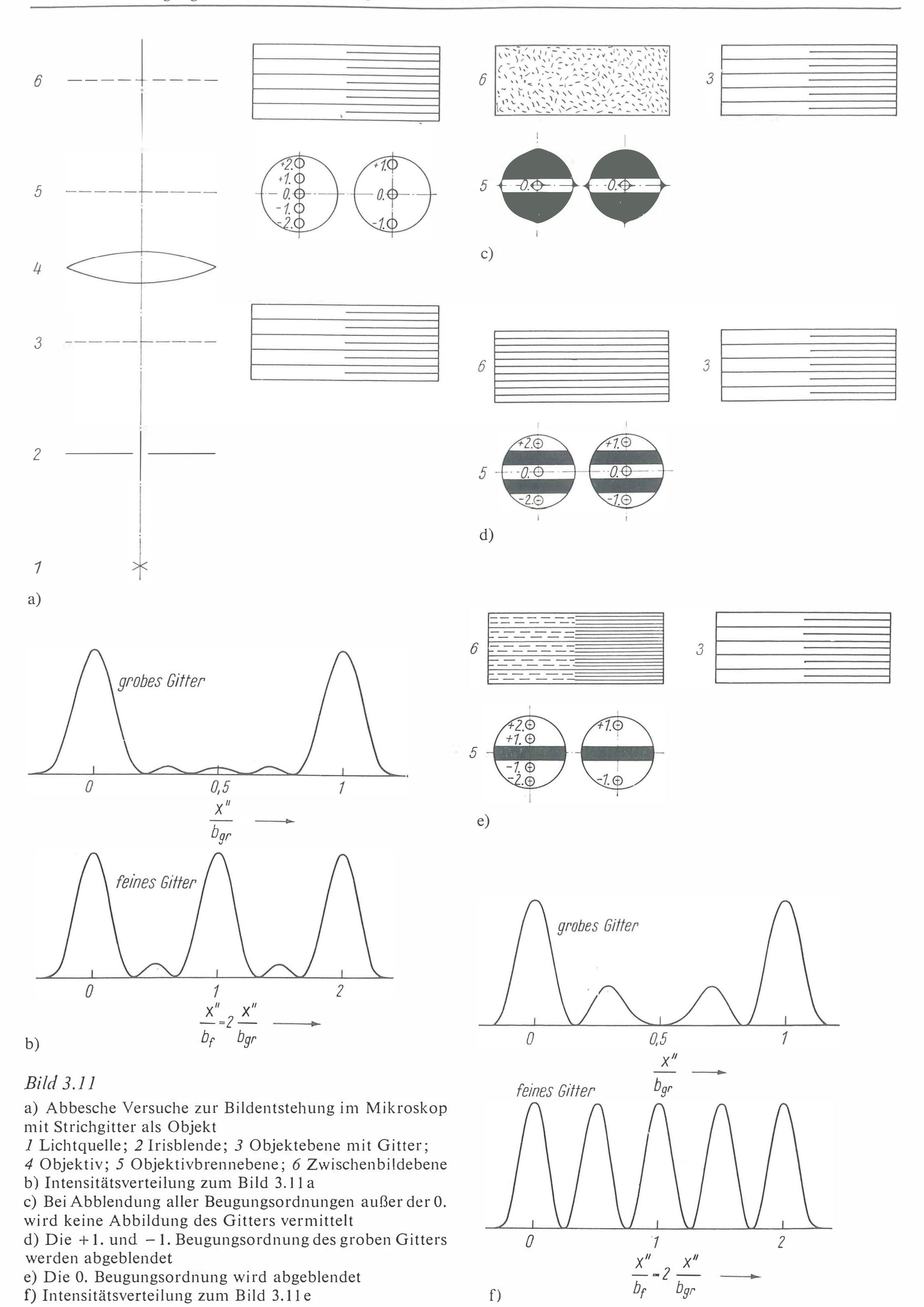


Bild 3.11

a) Abbesche Versuche zur Bildentstehung im Mikroskop mit Strichgitter als Objekt
1 Lichtquelle; *2* Irisblende; *3* Objektebene mit Gitter; *4* Objektiv; *5* Objektivbrennebene; *6* Zwischenbildebene
b) Intensitätsverteilung zum Bild 3.11a
c) Bei Abblendung aller Beugungsordnungen außer der 0. wird keine Abbildung des Gitters vermittelt
d) Die +1. und −1. Beugungsordnung des groben Gitters werden abgeblendet
e) Die 0. Beugungsordnung wird abgeblendet
f) Intensitätsverteilung zum Bild 3.11e

sind dafür vor allem ein Mikroskop mit einem schwachen Objektiv, dessen hintere Brennebene zugänglich ist, so daß dort Blenden verschiedener Gestalt eingeschoben werden können, sowie eine im Abstand von etwa 200 bis 250 mm aufgestellte Leuchte mit Irisblende. Ein Kondensor ist zunächst nicht erforderlich. Als Objekte werden, wie im Bild 3.11a gezeigt wird, zwei nebeneinanderliegende Strichgitter verwendet, deren Gitterkonstanten sich um den Faktor 2 unterscheiden und die so zur Objektivapertur abgestimmt sind, daß vom groben Gitter fünf, vom feinen Gitter drei Beugungsordnungen ins Objektiv gelangen. Als Testobjekte werden nur deshalb Gitter verwendet, weil diese in der Objektivbrennebene deutlich getrennte Beugungsordnungen liefern. Die Grundsatzüberlegungen gelten jedoch für beliebige Arten von Objekten.

Jede Beugungsordnung erzeugt ein Bild der Irisblende, die wie im Bild 3.11a zu erkennen ist, deutlich getrennt nebeneinanderliegen. Bei genügend großem Abstand der Irisblende zum Objektiv (groß gegen die Objektivbrennweite) liegen ihre Beugungsbilder in unmittelbarer Nähe der Objektivbrennebene und können nach Entfernen des Okulars mit dem bloßen Auge oder besser mit einem anstelle des Okulars eingeschobenen Hilfsmikroskop beobachtet werden.

Zunächst schieben wir das Okular wieder ein, beobachten das Gitterbild und stellen fest, daß die Gitterkonstanten richtig wiedergegeben werden.

Im Bild 3.11b wird die beugungstheoretisch berechnete relative, auf gleiche Gipfelhöhe normierte Intensitätsverteilung gezeigt. Die Darstellung bestätigt die richtige Wiedergabe der Gitterkonstanten, zeigt aber andererseits, daß die einzelnen Spalte zu breit dargestellt werden. Die Verfälschung ist bei dem feinen Gitter, wegen der geringeren Anzahl der mitwirkenden Beugungsordnungen, stärker als bei dem groben Gitter.

Danach wird eine solche Schlitzblende in die Objektivbrennebene eingeschoben, die nur die 0. Beugungsordnung hindurchläßt (Bild 3.11c). Die 0. Beugungsordnung allein kann kein Bild vermitteln; denn sie entspricht im Fall des Gitters dem direkten Licht, d.h., es wird kein gebeugtes Licht hindurchgelassen, was für die Bildentstehung mit einem strukturlosen Objekt, also einer homogenen Objektebene gleichbedeutend ist. Deshalb erscheint im Bild eine strukturlose Fläche.

Beim nächsten Versuch werden, wie im Bild 3.11d dargestellt, die beiden ersten Beugungsordnungen des groben Gitters abgedeckt, so daß für beide Gitter drei Beugungsordnungen mit gleichem Abstand zur Bildentstehung beitragen. Im Bild erscheinen deshalb beide Gitter mit gleicher Gitterkonstante, und zwar der des feinen Gitters.

Die Intensitätsverteilung entspricht der im Bild 3.11b für das feine Gitter dargestellten, wenn man die Abszisse mit 2 multipliziert.

Man kann auch, wie im Bild 3.11e gezeigt wird, die 0. Beugungsordnung abblenden und erhält damit das sog. zentrale Dunkelfeld.

Dann werden die Gitterabstände des groben Gitters durch die Hauptmaxima der Intensität richtig wiedergegeben. Das Ausblenden der 0. Beugungsordnung bewirkt lediglich das Auftreten von Nebenmaxima, die durch die gestrichelten Linien angedeutet werden.

Beim feinen Gitter betragen die Abstände der Intensitätsmaxima die Hälfte der Gitterkonstante, da sich durch Ausblenden der 0. Beugungsordnung der Abstand der vom Objektiv aufgenommenen Beugungsordnungen in der Objektivbrennebene verdoppelt hat. Wegen des Mitwirkens nur zweier Beugungsordnungen ist die Intensitätsverteilung in der Bildebene $\cos^2$-förmig (Bild 3.11f). Man beachte in beiden Fällen den Unterschied zum Bild 3.11b.

Wird als Objekt ein Kreuzgitter benutzt, dann ergibt sich in der Objektivbrennebene eine zweidimensionale Verteilung der verschiedenen Beugungsordnungen, wie es im Bild 3.12 für ein 90°-Kreuzgitter dargestellt ist. Entsprechend der zweifachen Mannigfaltigkeit der auftretenden Beugungsordnungen kann die Bildwirkung durch Ausblenden einzelner Beugungsordnungen in noch viel stärkerem Maße als beim Strichgitter variiert werden.

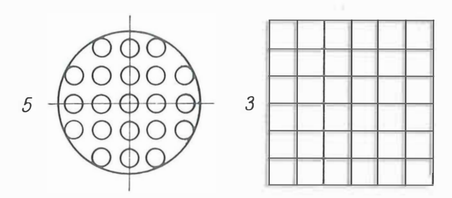


Bild 3.12. Wie Bild 3.11a, jedoch mit Kreuzgitter als Objekt

Läßt man nur eine Zeile der Beugungsordnungen zur Wirkung kommen, so erscheint im Bild ein senkrecht zur Zeilenrichtung orientiertes Strichgitter, dessen Gitterkonstante außerdem entsprechend Bild 3.11d variiert werden kann. Man kann aber auch das Bild eines Kreuzgitters mit

halbem Punktabstand oder ein schief liegendes Gitterbild erzeugen. Die vielen Möglichkeiten können hier nicht alle aufgeführt werden.
Die Auflösungsgrenze eines Objektivs war bei gerader Beleuchtung nach Gl. (3.6a) mit

$$b_{Gr} = \frac{\lambda}{A_{Obj}}$$

festgelegt. Wird das feine Gitter bei der Anordnung wie im Bild 3.11a durch ein noch feineres ersetzt, dann werden die beiden ersten Beugungsordnungen (+1. und −1.) vom Objektiv nicht mehr aufgenommen (im Bild 3.13a außerhalb der Pupille gezeichnet); das Gitter ist also nicht mehr aufgelöst (s. Bild 3.11c). Es müßte nach Gl. (3.6a) ein Objektiv mit größerem Öffnungswinkel, also größerer Apertur, oder zur Beleuchtung Licht kürzerer Wellenlänge verwendet werden. Bei einem stärkeren Objektiv werden die Beugungsbilder in der Objektivaustrittspupille stärker zusammengedrängt und ihr Abstand im umgekehrten Verhältnis zur Apertur verringert.

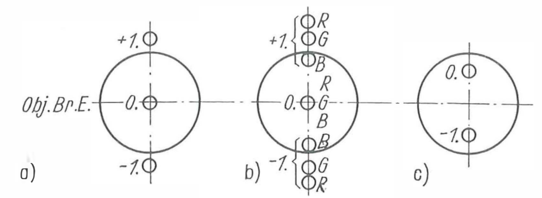
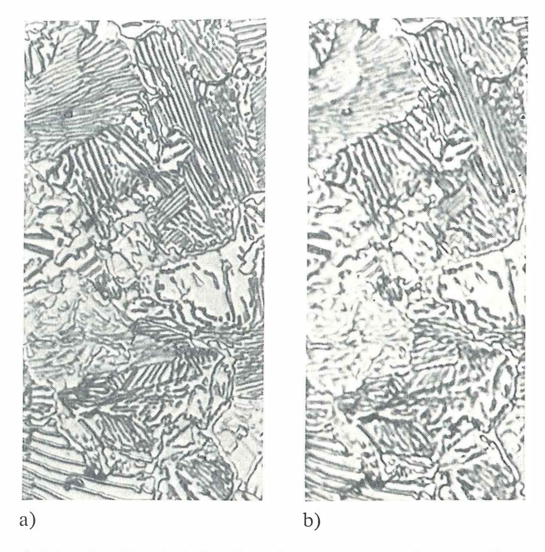


Bild 3.13

a) Die ersten Beugungsordnungen kommen nicht mehr ins Objektiv, das Gitter wird nicht aufgelöst
b) Abhängigkeit der Auflösungsgrenze von der Lichtwellenlänge
c) Steigerung der Auflösung durch schiefe Beleuchtung

Da der Sinus des Beugungswinkels nach Gln. (3.3a) und (3.3b) der Wellenlänge direkt proportional ist, wird bei gleichem Objektiv durch Licht kürzerer Wellenlänge die Auflösung erhöht. Das wird noch einmal im Bild 3.13b für die Farben Rot, Grün und Blau schematisch dargestellt. Die 0. Beugungsordnung fällt für alle drei Farben zusammen. Die Abstände der 1. Ordnung variieren im Verhältnis der Wellenlängen. Im Bild 3.13b wird z. B. das Gitter nur im blauen, aber nicht im roten oder grünen Licht aufgelöst.
Praktische Beispiele für die Erhöhung der Auflösung durch Vergrößerung der Objektivapertur und bei kleinerer Wellenlänge werden in den Bildern 3.14 und 3.15 gezeigt. Die im Bild 3.14a sichtbaren feinen, lamellaren Strukturen sind im Bild 3.14b z. T. nicht aufgelöst.

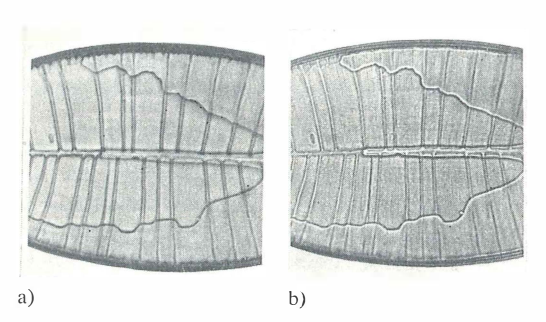
Die Abhängigkeit des Auflösungsvermögens von der Lichtwellenlänge ist in den Bildern 3.15a und b dargestellt. Erst bei Verwendung des Blaufilters sind auch die feinsten Strukturen aufgelöst.
Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung des Auflösungsvermögens, jedoch unter stärkerem Verzicht auf Objekttreue, besteht in der Verwendung der schiefen Beleuchtung. In der Anordnung im Bild 3.11a wird die Irisblende so weit schief gestellt, daß sich ihr direktes Bild, also die 0. Beugungsordnung im Bild 3.13c, am Rande der Aus-



a) b)

Bild 3.14. Einfluß der Objektivapertur auf die Auflösung

a) lamellarer Perlit, Apochromat 60 × /0,95;
b) das gleiche Objekt, Apochromat 32 × /0,65; M 800 : 1



a) b)

Bild 3.15. Einfluß der Lichtwellenlänge auf die Auflösung

a) Kieselalge Surirella gemma unter Verwendung des Orangefilters OG 2/2;
b) das gleiche Objekt und Objektiv mit Blaufilter BG 12/2; M 1000 : 1

trittspupille befindet. Von den ersten Beugungsordnungen, die im Bild 3.13a beide außerhalb der Austrittspupille liegen, wird eine vom Objektiv aufgenommen und das Gitter aufgelöst. Anstelle Gl. (3.6a) gilt dann Gl. (3.6b):

$$b_{Gr} = \frac{\lambda}{2 A_{Obj}}.$$

Allerdings treten dabei durch die schiefe Beleuchtung an jedem Gitterspalt unsymmetrische Doppelkonturen auf, die die Bildqualität beeinträchtigen.

Die wichtigsten Ergebnisse dieses Abschnitts sollen noch einmal kurz zusammengefaßt werden: Das mikroskopische Bild entsteht durch Interferenz des direkten und des am Objekt gebeugten Lichts. Das direkte Licht allein kann keinerlei Objektstrukturen übertragen. Obwohl die verschiedenen Beugungsordnungen (Beugungsbilder einer Lichtquelle) nur bei periodischen Objekten deutlich getrennt in der Objektivbrennebene erscheinen, gelten die grundsätzlichen Betrachtungen dieses Abschnitts auch für beliebige Objekte. Das gilt vor allem für die Tatsache, daß die Objekte um so objekttreuer abgebildet werden, je mehr Beugungsordnungen das Objektiv aufnimmt, d.h., je größer seine Apertur ist. Jede Aperturbegrenzung entspricht einem Eingriff in das Beugungsbild und legt die Leistungsgrenze (Auflösungsvermögen) des Mikroskops fest. Das zur Auflösungsgrenze reziproke Auflösungsvermögen ist der Objektivapertur direkt und der verwendeten Lichtwellenlänge umgekehrt proportional.

4. Mechanischer Aufbau des Mikroskops und seine Pflege

von Ing. *Friedrich Schüller*

4.1. Fokussierbewegung

An der einfachsten Art des zusammengesetzten Mikroskops (Bild 4.1) sind die Urform und der Kern vieler bekannter Mikroskopausführungen zu erkennen. Ein Stativ *1* mit der Auflage *6* für das Präparat trägt den Tubus *4* mit Objektiv *5* und Okular *3* sowie die Beleuchtungseinrichtung *7*, in diesem Fall einen Spiegel, der die Strahlen einer Lichtquelle zum Tubus umlenkt. Für das Scharfeinstellen auf das Objekt wird das Objektiv mit einem Trieb *2* zum Präparat bewegt. Dieses Scharfeinstellen – das Fokussieren – ist die erste und immer wiederkehrende Handhabung am eingerichteten Mikroskop. Es darf an den Beobachter keine besonderen Anforderungen stellen und muß ohne Beeinträchtigung der Konzentration auf die Untersuchungsarbeit – praktisch nebenbei – erfolgen.
Genügt für die Fokussierbewegung bei schwachen Vergrößerungen eine Grobeinstellung, so verfügt ein Mikroskoptyp, der bis zu höchsten Vergrößerungen ausgerüstet werden kann, über Grob- und Feineinstellung. In Sonderfällen ist für

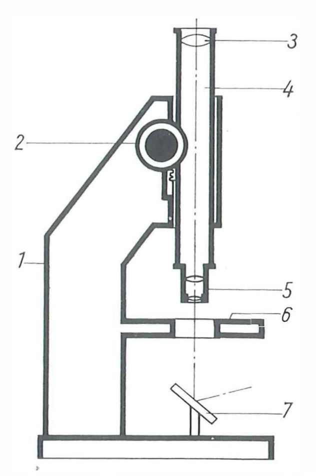


Bild 4.1. Zusammengesetztes Mikroskop, prinzipieller Aufbau

Mikroskope umgekehrter Bauart die Feineinstellung allein ausreichend, für solche aufrechter Bauart nur dann, wenn Präparate annähernd gleicher Höhe zu untersuchen sind und der freie Objektabstand den Präparatwechsel ohne Schwierigkeiten zuläßt.

4.1.1. Führung

Für die Fokussierbewegung am Mikroskop müssen Führungen verwendet werden, die geringe Reibung, eine geringe Differenz der Reibwerte der Ruhe und Bewegung und eine hohe Steifigkeit aufweisen. Eine Führung, bei der diese Forderungen im Zusammenwirken ein Optimum darstellen, geht gleichmäßig, zeigt eine geringe Umkehrspanne und ist gegen Schwingungen weitgehend unempfindlich.
Für die Fokussierbewegung kommen hauptsächlich Gleit-, Kugel-, Rollen- oder Federbandführungen zum Einsatz. Hydraulische oder Luftführungen bedingen einen höheren Aufwand und haben bisher nur bei Spezialmikroskopen Eingang gefunden.
Führungen sind engtoleriert zur optischen Achse ausgerichtet. Mit dieser Maßnahme ist bei richtig eingestellter Beleuchtung ein *Schieben* des Bilds beim Fokussieren ausgeschlossen.
Sind in einem Mikroskop Grob- und Feinbewegung eingebaut und beide Bewegungen getrennt geführt, wirkt eine auf den Tubusträger oder das Objektiv und eine auf den Objekttisch. Haben beide Bewegungen eine gemeinsame Führung, gibt es folgende Anordnungen:

Objekttisch wird bewegt, Tubusträger ist fest. Tubusträger wird bewegt, Objekttisch ist fest. Objektiv wird bewegt, Objekttisch und Tubusträger sind fest. Wird das Objektiv bewegt, sind auf *unendliche Bildweite* korrigierte Objektive zweckmäßig. Diese Anordnung kommt nur mit Einschränkung bei kleinem Fokussierbereich in Betracht.

Zum Teil wird durch definierte Endlagen für die bewegte Einheit – Objekttisch, Tubusträger oder Objektiv – der Abstand Objekttisch zum Objektiv so groß gehalten, daß ein Präparateschutz gewährleistet ist.

4.1.2. Trieb

Der Trieb leitet die Fokussierbewegung ein. Zur optimalen Scharfeinstellung des Objekts pendelt der Beobachter um die Schärfenebene. Da die Schärfentiefe bei den hohen Vergrößerungen der Lichtmikroskopie < 1 µm ist, muß die Umkehrspanne des Triebs auch in dieser Größenordnung gehalten werden. Gleichzeitig muß die Feinfühligkeit so groß sein, daß ohne Mühe gezielt auf jede Ebene des Präparats eingestellt werden kann. Es ist offensichtlich, daß zur Erfüllung der letzten Forderung ein großer Drehwinkel am Triebknopf für kleine Verstellbewegungen erforderlich ist; man spricht in diesem Fall von der Feineinstellung. Sind Grob- und Feineinstellung am Mikroskop vorhanden, ist folgendes möglich:

Grob- und Feintrieb getrennt gelagert;
Kombinationstrieb mit Einknopfbedienung;
Grob- und Feintrieb koaxial gelagert.

Kombinationstriebe mit Einknopfbedienung sind in ihrer Handhabung unterschiedlich. Während man bei dem „Simultantrieb" (Bild 4.2) die Grobbewegung durch Drehen und die Feinbewegung durch Schwenken des gleichen Triebknopfs erreicht, gibt es Kombinationstriebe, deren Feinbereich von z. B. 0,1 mm derart in den Grobbereich eingelagert ist, daß der Feintrieb bei jeder Stellung des Grobtriebs in Funktion gesetzt werden kann.
Im Bild 4.3 wird aus der Vielzahl der koaxial gelagerten Triebe ein Beispiel erläutert. Ein Abtriebsrad *4* greift direkt oder über ein Vorgelege in eine Zahnstange, die an einer Führung befestigt ist,

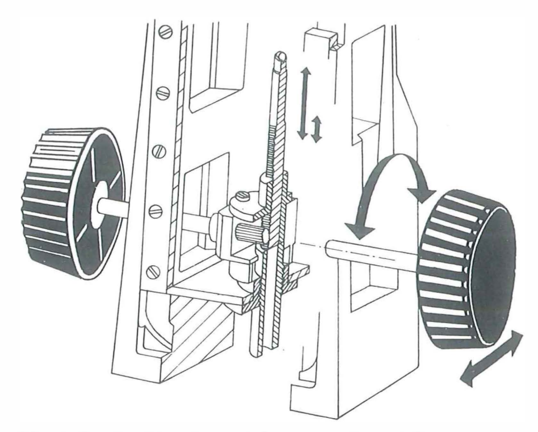


Bild 4.2. Kombinationstrieb – Simultantrieb
Firma C. Reichert, Optische Werke AG, Wien
Das Drehen des Triebknopfs bewirkt die Grobbewegung, das Schwenken die Feinbewegung

ein. Die Gewichtskraft dieser Führung und der mit ihr verbundenen Einheit – Tubus, Objektiv oder Objekttisch – drückt die fertigungsbedingte Lose im Eingriff der Zahnstange und in den nachfolgenden Zahnrädern heraus. Die Antriebe sind abgebremst, damit das System nicht von allein abläuft. Während sich die Feintriebwelle *3* dabei noch spielend leicht betätigen läßt, ist der Grobtrieb schwergängig. Diese Schwergängigkeit ist in Grenzen durch das Gegeneinanderdrehen der beiden Grobtriebknöpfe *1* und *6* einstellbar. Die Einstellung erfolgt nach individuellen Kriterien.
Einmal werden wechselnde Belastungen auf die Führung – unterschiedliche Präparatmassen oder Ausrüstungseinheiten – ausgeglichen, zum anderen empfinden die einzelnen Beobachter ein mehr oder weniger großes Drehmoment angenehm.
Eine Überlastkupplung *2* schützt den Trieb gegen Zerstörung. Harte Anschläge *7* begrenzen den Grobtriebbereich. Der Feintrieb wirkt über den gesamten Grobtriebbereich und verhindert so das

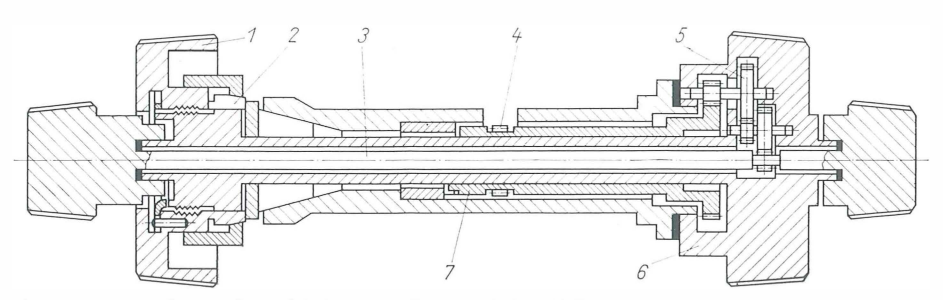


Bild 4.3. Koaxialer Grob- und Feintrieb VEB Carl Zeiss JENA

lästige „Auslaufen“ der Feinbewegung während einer Untersuchung.
Die Untersetzung des Feintriebs erfolgt über ein im Grobtriebknopf eingeschlossenes Räderwerk 5. Wird der Grobtrieb betätigt, blockieren die Räder und laufen um die Längsachse des Triebs mit. Ein Anschlag für die Feinbewegung wird nicht empfunden, da am Ende des Verstellbereiches die Grobbewegung gegenläufig ist.
Im Rahmen der Mechanisierung wird das Scharfeinstellen am Mikroskop auch mit einem Schalter für Hand- und Fußbedienung über Motor und Getriebe vorgenommen. Diese Antriebe können für Grob- und Feinbewegung, auch kombiniert mit bekannten Handantrieben, Anwendung finden. Für automatische Abläufe wird der Trieb elektronisch gesteuert.

4.2. Qualitätsmerkmale des Mikroskops (mechanisch)

Stabilität

Wechselnde Belastungen auf das Mikroskop – bedingt durch unterschiedliche Präparatmassen, ausgetauschte oder zusätzlich angebrachte Ausrüstungseinheiten, sich bewegende Massen und die erforderlichen Handgriffe beim Einstellen – dürfen keine die Funktion störenden elastischen Verformungen hervorrufen.
Trennstellen, die an ausbaufähigen Geräten unerläßlich sind, dürfen zu keiner Minderung der Stabilität führen. Die Eigengewichtskraft des Mikroskops muß so groß sein, daß sich der Standort während der Bedienung nicht ändert. Unter der Gewichtskraft zusätzlicher Ausrüstungseinheiten darf die Standfestigkeit nicht leiden.
Mit der gewählten Verpackung muß bei normalen Transportverhältnissen die Überführung des Mikroskops vom Hersteller zum Kunden ohne Schäden garantiert sein.

Schwingungsdämpfung

Bei der Beurteilung des Schwingungsverhaltens eines Mikroskops sind die Anregungsbedingungen entscheidend. Die Eigenschwingungen von Gebäuden dürfen sich nicht so übertragen, daß die Bildgüte des Mikroskops merklich beeinflußt wird. Werden die Eigenschwingungen durch Schwingungen abnormaler Erreger – wie Kompressoren, Walzstraßen – überlagert, ist bei dem starren Aufbau und der damit verbundenen hohen Eigenfrequenz des Mikroskops keine solche Dämpfung zu erwarten, daß einwandfreies Mikroskopieren bei starken Vergrößerungen gewährleistet ist. Für diese Fälle haben größere Mikroskope bereits eine zusätzliche schwingungsdämpfende Einrichtung. Für kleinere Mikroskope ist eine entsprechende Unterlage zu empfehlen.
Schwingungserreger am Mikroskop (z.B. pulsierende Aggregate) müssen schwingungsgedämpft eingebaut oder vom Mikroskop getrennt sein.

Ansprechgenauigkeit

Für ein Mikroskop, das bis zu den stärksten Vergrößerungen der Lichtmikroskopie eingesetzt wird, ist die Ansprechgenauigkeit der Feineinstellung von entscheidender Bedeutung. Der Benutzer darf während seiner Arbeit mit höchsten Vergrößerungen keine Lose bei der Scharfeinstellung empfinden.
Weitere Einstellvorrichtungen müssen so ausgebildet sein, daß der Benutzer die durch Fertigungstoleranzen und elastische Verformung auftretende Lose nicht störend empfindet.

Umkehrspanne

Sowohl an Meßtrieben als auch an Einstelltrieben, die als Meßtriebe benutzt werden können, muß die Umkehrspanne klein sein. Sie ist der Anzeigeunterschied, der auftritt, wenn die gleiche Meßgröße beim Einstellen von kleinerer Anzeige zu größerer einen anderen Meßwert als beim Einstellen von größerer Anzeige zu kleinerer ergibt.
Durch Einstellen in einer Richtung vor jedem Ablesen einer Anzeige läßt sich die Umkehrspanne gänzlich vermeiden. Wird die zu messende Bewegung direkt am bewegten System abgelesen, so tritt die Umkehrspanne nicht auf. Diese Art beschränkt sich aber ohne optische Hilfsmittel oder vom Antrieb getrennte Meßwerke auf Meßwerte $\geqq 0{,}1$ mm.

Drehmomente

Übersetzung und Gängigkeit der Triebe müssen ein gezieltes Einstellen der bewegten Einheit an dem bestimmten Ort gewährleisten. Die dazu erforderlichen Drehmomente werden im Herstellerwerk abgestimmt. In Einzelfällen (z.B. zur Abstimmung auf die veränderliche Größe der bewegten Last) sind sie durch den Anwender einstellbar. Drehmomente an laufend zu betätigenden Einstelltrieben sollen möglichst klein sein, um Ermüdungen des Benutzers weitgehend zu vermeiden. Ist beim Einstellen mit solchen Trieben das Auflegen der Hand möglich, so spricht

dies für den Bedienungskomfort des Geräts. Zur Überwindung größerer Drehmomente – bei Klemmen und bei gelegentlich zu bedienenden Einstellungen – können geeignete Schlüssel benutzt werden.

Rastgenauigkeit

Schnelles Um- und Zuschalten einzelner Systeme in den Strahlengang des Mikroskops sind die Gewähr für rationelle Arbeitsweise. Die einmal zentrierten Einheiten müssen nach dem Schaltvorgang exakt einrasten. Es ist nicht zu vertreten, daß z.B. beim Umschalten der Objektive das vorher eingestellte Objekt erst wieder gesucht werden muß oder das Zuschalten einer Hilfslinse am Kondensor ungewollt eine schiefe Beleuchtung hervorruft. Ferner darf der Schaltvorgang den Benutzer des Mikroskops nicht in der Untersuchungsarbeit beeinträchtigen. Die Raststellen müssen deshalb so ausgebildet sein, daß beim Schalten leichter Einlauf in die Raste gewährleistet ist, aber das ungewollte Überfahren bei sachgemäßer Bedienung vermieden wird.

Temperaturgang

Eingebaute Leuchten finden bei der geschlossenen Bauweise der Mikroskope immer häufiger Anwendung. Ein gewisser Temperaturgang – die Änderung des Mikroskops durch Temperatureinflüsse – nach dem Einschalten der Lampe ist bei dieser Anordnung nicht zu vermeiden. Der Benutzer darf aber Auswirkungen auf die mechanische Funktion, das Mikroskopieren und die Mikrofotografie mit kurzen Belichtungszeiten nicht wahrnehmen.
Kommen längere Belichtungszeiten vor, wie sie für stark absorbierende oder gering reflektierende Objekte sowie Verfahren, die eine erhebliche Schwächung des Lichts bewirken, erforderlich sind, so werden meist stärkere Lichtquellen eingesetzt, deren besondere Lampengehäuse außerhalb des Mikroskopstativs liegen, aber in besonderen Kammern gekapselt sind. Die Anordnung der Lampengehäuse und die Filterung des Lichts lassen nur einen geringen Wärmeübergang von den Lampen zu den mechanischen und optischen Bauteilen zu. Die Wärmeentwicklung eingebauter Motoren oder anderer elektrischer Baueinheiten in größeren Mikroskopen sind weitere störende Einflußgrößen. In speziellen Fällen sind Kühleinrichtungen unerläßlich.
Der verbleibende Einfluß des Temperaturgangs auf die Arbeit des Mikroskopierenden ist ein weiteres Maß für die Güte des Mikroskops. Wirken äußere Temperatureinflüsse auf die Funktion störend, ist ein geschlossenes Gehäuse über sämtliche Bauteile von Vorteil.

Wartungsfreiheit

Von einem modernen Mikroskop verlangt man, daß sich die Wartung auf das Sauberhalten des Mikroskops und das Auswechseln elektrischer Bauelemente beschränkt. Führungen und Triebe müssen so ausgebildet sein, daß die Funktion ohne Einschränkung über Jahre gewährleistet ist.
Das Nachfetten von Gleittischen oder erforderliche Korrekturen und das Austauschen von Bauelementen an Spezialmikroskopen sind Sonderfälle.

4.3. Mechanische Verwirklichung der optischen Achse

4.3.1. Durchlichtmikroskop

Der für ein modernes Durchlichtmikroskop typische Aufbau wird im Bild 4.4 gezeigt. Mitbestimmend sind, abgesehen von einfachsten Mikroskoptypen, die horizontale Lage des Objekttisches *7* und der Schrägeinblick für die visuelle Beobachtung.
Die z.T. im Fuß *13* des Stativs eingebaute Beleuchtungseinrichtung gewährleistet die geschlossene Bauweise des Mikroskops und läßt für die Bedienung drei Seiten frei. Dem Köhlerschen Beleuchtungsprinzip entsprechend, wird die Lichtquelle der fokussier- und zentrierbaren Einbauleuchte *19* durch den fest stehenden Kollektor *16* in die Mitte der Aperturblende *9* abgebildet. Mit einer Klemmeinrichtung *18* läßt sich diese Einstellung fixieren. Die exakte Abbildung der Lichtquelle auf die Aperturblende kann man auch mit einem fokussier- und zentrierbar angeordneten Kollektor bei fest stehender Leuchte erreichen. Wechselbare Einbauleuchten gestatten die Beleuchtung mit stärkeren Lichtquellen durch den Fuß des Mikroskops. Eine Mattscheibe *17* zwischen Lampe und Kollektor, ein- und ausschaltbar angebracht, beseitigt im Bedarfsfall die Struktur des Wendelbilds. Um eine scharfe Abbildung der Leuchtfeldblende *15* in die Objektebene zu erreichen, hat der Kondensor 8 eine in Richtung der optischen Achse wirkende Einstellvorrichtung *11*, in den meisten Fällen in einer Ausführung, die der Grobeinstellung der Fokus-

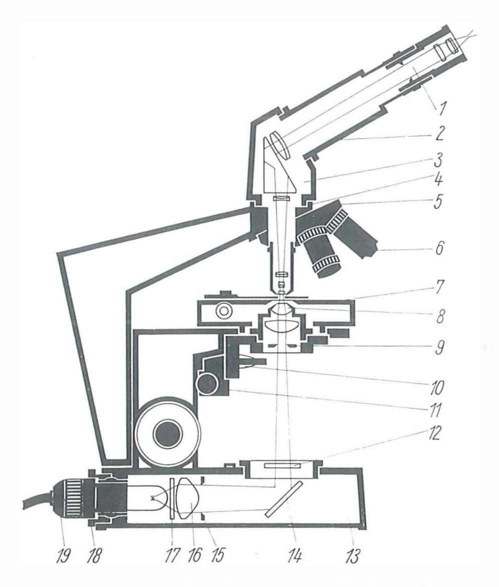


Bild 4.4. Durchlichtmikroskop aufrechter Bauart

Aufbauschema: Die Umhüllung des Strahlenbündels ist für eine bestimmte Objektgröße und eine bestimmte Apertur dargestellt am Beispiel des ERGAVAL vom VEB Carl Zeiss JENA

sierbewegung entspricht. Exakte zentrische Abbildung der Leuchtfeldblende wird erzielt, wenn von den drei Einheiten – Leuchtfeldblende, Umlenkspiegel *14*, Kondensor – eine zentrier- bzw. einstellbar ist.

Neben der dargestellten Beleuchtungseinrichtung sind andere und vereinfachte Prinzipe möglich. Die Kondensoren, meist wechselbar, werden in mannigfaltiger Form und Ausführung angeboten. So sind an einem modernen Mikroskop die Hellfeldkondensoren zwei- oder dreistufig ausgebildet, um für die verschiedenen Vergrößerungen günstige Beleuchtungsverhältnisse hinsichtlich Apertur- und Leuchtfeldgröße zu erreichen. Am Mikroskop (Bild 4.4) läßt sich zur Ausleuchtung großer Objektfelder bei schwachen Vergrößerungen eine Linse *10* vorschalten. Durch einen Kondensor mit pankratischem Beleuchtungssystem kann die zur Verfügung stehende Lichtmenge bei allen Objektiven vollkommen genutzt werden. Das aus der Lichtquelle kommende Licht wird wahlweise in ein Bündel mit großem Leuchtfeld und kleiner Apertur oder umgekehrt umgeformt und so dem verwendeten Objektiv angepaßt. Mit einem Handgriff stellt man an einem derartigen Kondensor die entsprechende Beleuchtung ein. Für Kontrastverfahren, die Ringblenden in der Eintrittspupille des Mikroskops benötigen, werden spezielle Kondensoren mit fest eingebauten oder mit einsetzbaren Ringblendenrevolvern verwendet. Die Ringblenden werden mit Zentrierschrauben zur optischen Achse justiert.

Umfassend wurde über Kondensoren im Abschnitt 2.7. berichtet. Auf dem Stativfuß, z. T. auch am Kondensor, befindet sich eine Aufnahme *12* für Lichtfilter oder Filter-Polarisatoren. Der Aufnahmedurchmesser an dieser Stelle ist mit 32,2 mm für Filterdurchmesser von 32 mm standardisiert.

Anstelle der Filteraufnahme lassen sich Umlenkspiegel einsetzen. Bestimmte Mikroskoptypen nehmen an gleicher Stelle auch einfache Leuchten oder umfangreiche Beleuchtungseinrichtungen auf.

Für quantitative Untersuchungen im polarisierten Licht müssen die optischen Glieder zwischen Filter-Polarisator und Objekt so sorgfältig gefertigt sein, daß keine entscheidende Beeinflussung der Meßergebnisse durch verbleibende Restspannungen auftritt. Das gilt auch für den Analysator, der bei derartigen Untersuchungen im objektabbildenden Strahlengang angeordnet ist.

Polarisator und Analysator bei stärkeren Vergrößerungen direkt vor bzw. hinter dem Objekt einzufügen, ist wegen der geringen freien Objektabstände zwischen Kondensor und Objekt einerseits sowie Objekt und Objektiv andererseits nicht möglich.

Auf einem Objekttisch – fest oder wechselbar – werden die Präparate mit Tischfedern aufgeklemmt, in Präparathaltern befestigt oder einfach lose aufgelegt.

Der Tubus des Mikroskops besteht, entsprechend der geforderten Ausbaufähigkeit, aus mehr oder weniger Einheiten. Der unterste Teil ist als Objektivwechselvorrichtung *5* ausgebildet, damit man die zur Mikroskopausrüstung gehörenden Objektive *6* in schneller Folge in den Strahlengang bringen kann. Diese Wechselvorrichtung ist am Tubusträger *4*, der selbst einen Teil des Tubus darstellt, fest oder austauschbar befestigt.

Auf dem Tubusträger setzt sich das Tubusoberteil *2* mit der Okularaufnahme direkt oder über einen Zwischentubus *3* auf. Das Okular *1* ist in das Tubusoberteil eingesteckt. Anstelle der Tubusoberteile für den visuellen Einblick lassen sich Demonstrationsaufsätze, Zeichen- und Projektionsspiegel oder -prismen sowie die Bausteine mikrofotografischer Einrichtungen ansetzen. Diese Bausteine ermöglichen eine einfache, schnelle und bequeme Dokumentation der Ergebnisse und Untersuchungen mit dem Mikroskop.

Sämtliche Einheiten, von der Lichtquelle bis zum Okular, sind zentriert oder lassen sich vom Benutzer so eindeutig zentrieren, daß keine störende Beeinträchtigung der Bildgüte eintritt. Das trifft auch für die Abstimmung in Richtung der optischen Achse zu.

Zur Beobachtung der hinteren Brennebene der Objektive, wie sie für Untersuchungen im polarisierten Licht und die Zentrierung der Ringblenden bei Kontrastverfahren in Frage kommt, kann entweder eine Hilfslinse im Tubus schaltbar angeordnet sein oder ein Hilfsfernrohr verwendet werden, das anstelle des Okulars eingesetzt wird.

Die Weglänge im Tubus ist nicht bei allen Mikroskopen gleich. Man ist dazu übergegangen, auf dem Objektiv neben der Vergrößerung, Apertur und Deckglasdicke die Tubusweglänge, für die das Objektiv korrigiert ist, zu gravieren. Kommen Objektive, die auf „unendliche Bildweite" korrigiert sind, zum Einsatz, ist zur Abbildung in die Brennebene des Okulars eine Tubuslinse erforderlich. Die auf den Objektiven angegebene Vergrößerung ist auf eine Tubuslinse mit 250 mm Brennweite bezogen. Um die wirksame Vergrößerung dieses Objektivtyps bei abweichender Brennweite f in mm der Tubuslinse zu erhalten, ist die angegebene Vergrößerung des Objektivs mit dem Faktor $f/250$ zu multiplizieren. Dieser Faktor ist gut sichtbar auf dem Tubusteil, in dem sich die Tubuslinse befindet, angebracht.

Verursacht außer der Tubuslinse eine der Einheiten des Tubuskomplexes eine abweichende Tubusweglänge, so ist die Abweichung ebenfalls in Form eines Faktors vermerkt. Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops setzt sich dann aus dem Faktor der Objektivvergrößerung, dem Faktor der Okularvergrößerung und den am Tubus angegebenen Vergrößerungsfaktoren zusammen.

4.3.2. Auflichtmikroskop

Ein Auflichtmikroskop – im Bild 4.5 in aufrechter Bauart dargestellt – gleicht im objektabbildenden Teil im wesentlichen dem Durchlichtmikroskop (s. Abschn. 4.3.1.). Nur verwendet man in den meisten Fällen auf „unendliche Bildweite" abgestimmte Objektive, um im parallelen Strahlengang zwischen Objektiv *16* und Tubuslinse *12* das reflektierende Element *13* zum Einspiegeln der Beleuchtung günstig unterzubringen. Das Objektiv übernimmt zusätzlich die Funktion des Kondensors.

Eine wechselbare Ansteckleuchte *4* gleicht in der Funktion und im prinzipiellen Aufbau einer Durchlichtleuchte. Die gezeigte Anordnung der Beleuchtungseinrichtung entspricht wieder dem Köhlerschen Prinzip. Die Lichtquelle *2* wird durch den Kollektor *3* in eine zur Brennebene des Objektivs konjugierte Ebene, in der sich die Aperturblende *6* befindet, abgebildet. Die beiden Linsen *7* und 10 bilden letztere in die Brennebene des Objektivs ab.

Die Leuchtfeldblende *8* ist so justiert, daß sie von der folgenden Linse in das „Unendliche" und

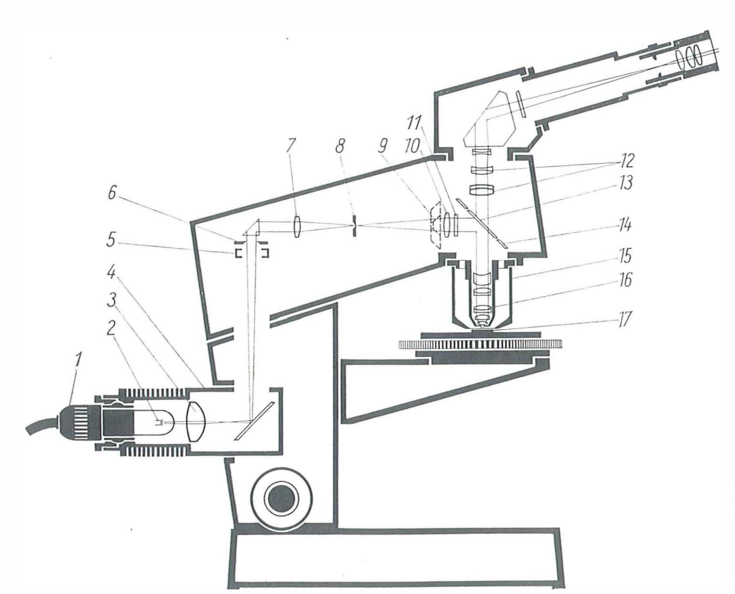


Bild 4.5
Auflichtmikroskop aufrechter Bauart

Aufbauschema: Die Umhüllung des Strahlenbündels ist für eine Objektgröße Null und eine bestimmte Apertur dargestellt am Beispiel des VERTIVAL vom VEB Carl Zeiss JENA

vom Objektiv in die Objektebene *17* abgebildet wird.
Apertur- und Leuchtfeldblende sind meist einstell- und zentrierbar, gelegentlich auch austauschbar angeordnet, oder sie haben für besondere Aufgaben in unmittelbarer Nähe eine zugängliche Ebene. So ist z.B. für Phasenkontrast- und Interferenzkontrastverfahren eine Aufnahme *5* für Blenden oder Gitter direkt vor der Aperturblende angeordnet.
Für Untersuchungen im polarisierten Licht wird der Polarisator *11* möglichst direkt vor der Strahlenumlenkung eingebaut, um Fehler durch weitere dazwischenliegende Linsensysteme zu vermeiden. Zur Strahlenumlenkung werden bei Hellfeldbeleuchtung halbdurchlässige Plangläser, Teilungswürfel, Halbspiegel und Kompensationsprismen (Bild 4.6) angewendet. Bevorzugt man Plangläser und Teilungswürfel bei Strukturuntersuchungen, sind Kompensationsprismen in Polarisationsmikroskopen bei qualitativen und quantitativen Beurteilungen der Anisotropie-Effekte von Vorteil. Ermöglichen Planglas und Teilungswürfel nur eine theoretische Lichtausbeute von 25%, so beträgt sie beim Halbspiegel und bei dem Kompensationsprisma 50%, doch muß in diesem Fall die steilschräge Beleuchtung in Kauf genommen werden.
Die Lichttreppe *9* ersetzt bei einer allseitigen Dunkelfeldbeleuchtung die zweite Hilfslinse *10* und formt das kreisförmige Lichtbündel in ein ringförmiges um. Über den festen Ringspiegel *14* und den Hohlspiegelkondensor *15* gelangt dieses Lichtbündel so auf das Objekt, daß keine an einer zur optischen Achse senkrechten Ebene reflektierten, sondern nur abgebeugte und an geneigten Flächen reflektierte Strahlen in das Objektiv gelangen. Die Objekteinzelheiten erscheinen dann hell auf dunklem Untergrund. Zur Vermeidung von Lichtverlusten und Reflexen wird bei der Dunkelfeldbeleuchtung das reflektierende Element für die Hellfeldbeleuchtung ausgeschaltet.

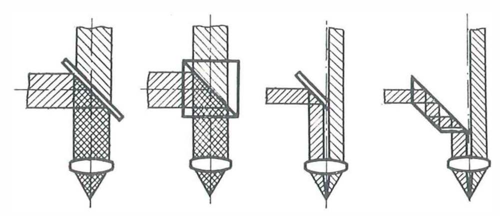


Bild 4.6. Reflektierende Elemente für Auflicht-Hellfeldbeleuchtung
von links nach rechts: halbdurchlässiger Spiegel; Teilungswürfel; Halbspiegel; Kompensationsprisma

Diese Beleuchtungsanordnung für Auflicht ist nicht in jedem Fall erforderlich. Davon abgeleitete, vereinfachte Prinzipe genügen oft den Anforderungen. Dunkelfeldbeleuchtungen, einseitig schräg oder allseitig mit einer besonderen Lichtquelle, werden seltener, hauptsächlich für schwächere Vergrößerungen angewendet.

4.4. Baukastensystem des Mikroskopbaus

Mikroskope auf der Grundlage eines Baukastensystems aufzubauen, hat sich überall durchgesetzt und bewährt. Der Anwender ist in der Lage, den Anwendungsbereich seines Geräts jederzeit durch Ergänzungseinheiten zu erweitern. Der Hersteller kann – bei einer wirtschaftlichen Fertigung – für alle Anwendungsgebiete der praktischen Mikroskopie eine breite Palette optimal ausgerüsteter Mikroskope anbieten. Der perspektivischen Entwicklung in Wissenschaft und Technik wird damit gleichermaßen Rechnung getragen.

4.4.1. Bausteine

Innerhalb eines Baukastensystems sind die Bausteine mit gleichen Merkmalen in Gruppen zusammengefaßt. Dabei wird nicht unbedingt gefordert, daß sämtliche Anschlußmaße der Bausteine einer Gruppe gleich sind. Es ist viel wichtiger, mit unterschiedlichen Anschlüssen falsche Kombinationen zu unterbinden.
Im folgenden werden hauptsächlich Bausteingruppen eines Baukastensystems des VEB Carl Zeiss JENA behandelt. Das schließt nicht aus, daß andere Herstellerwerke ähnliche Baukastensysteme für Mikroskope entwickelt haben. Es ist aber nicht sinnvoll, Bausteine der unterschiedlichen Systeme bei einer Erläuterung miteinander in Verbindung zu bringen. Die Bausteingruppen Objektive, Okulare und Kondensoren sind in den Abschnitten 2.5, 2.6. und 2.7. beschrieben und werden nicht wiederholt. Die Beschreibung beschränkt sich auf die Grundbausteine des Mikroskopbaus. Spezielle Bausteine für die Mikroskopierverfahren Phasenkontrast, Interferenz, Polarisation (quantitativ) und Fluoreszenz sowie die Mikroskopfotometrie, Mikroskopie mit unsichtbaren Strahlen, Mikroskopie unter besonderen Temperatur- und Klimabedingungen, Stereomikroskopie, Mikrohärteprüfung, Bildwieder-

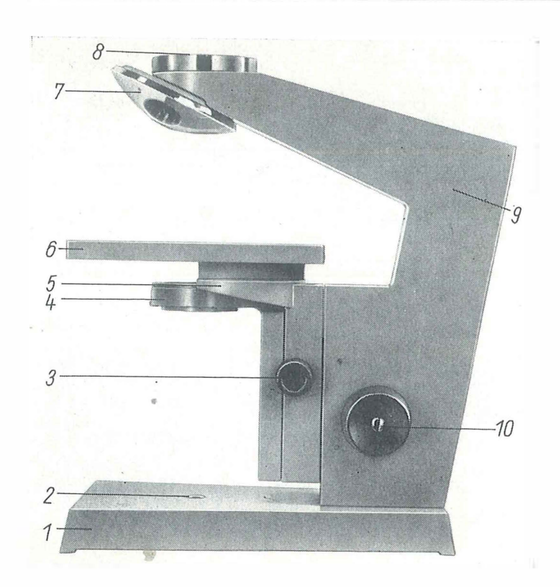


Bild 4.7. Stativ eines Durchlicht-Routinemikroskops
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

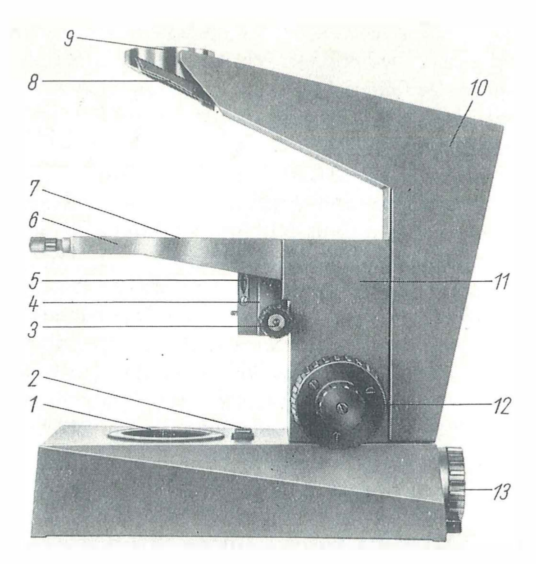


Bild 4.8. Stativ eines Durchlicht-Forschungsmikroskops
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

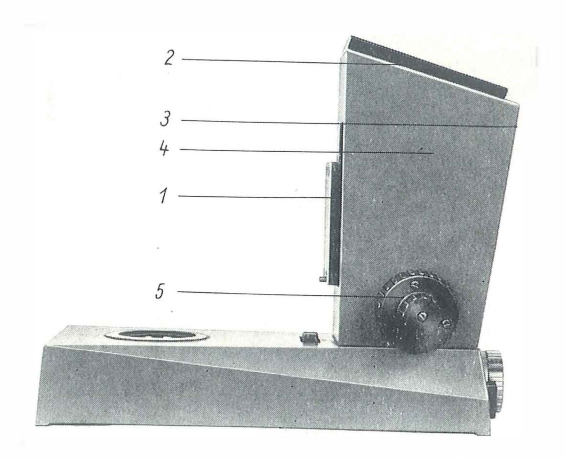


Bild 4.9. Stativ eines Durchlicht- und Auflicht-Forschungsmikroskops
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

gabeverfahren und das Zählen und Messen am Mikroskop werden in den entsprechenden Abschnitten dieses Handbuches behandelt.

Stative

Im Gesamtaufbau des Mikroskops ist das Stativ der mechanische Grundbaustein, um den sich die weiteren Bausteine gruppieren. Das Stativ eines Durchlicht-Routinemikroskops (Bild 4.7) besteht z.B. aus dem Stativfuß *1* mit einer Aufnahmebohrung *2* für einen Beleuchtungsspiegel oder eine Leuchte, dem Triebgehäuse *9* mit Tubusträger und eingebauter Kugelführung für die Fokussierbewegung, dem Kombinationstrieb *10*, der Aufnahme für Tubusteile *8*, dem Objektivrevolver *7*, dem Objekttischträger *5* mit eingeschlossener Kondensorführung, Kondensortrieb *3* und Klemmhülse für die Kondensoren *4* sowie festem Objekttisch *6*.
Ein Kombinationstrieb mit Einknopfbedienung – beiderseitig bedienbar – wirkt auf den Objekttischträger. Der Grobtriebbereich beträgt 20 mm.
Im Fuß des Stativs für ein Durchlicht-Forschungsmikroskop der gleichen Baureihe (Bild 4.8) ist ein Teil der Beleuchtungseinrichtung untergebracht, die Aufnahme für eine Leuchte *13*, der Kollektor, die Leuchtfeldblende und der Umlenkspiegel. Über den Rändelring *2* läßt sich die Leuchtfeldblende öffnen und schließen. Das mit dem Stativfuß fest verbundene Triebgehäuse *11* ist vom Tubusträger getrennt und bildet mit dem Objekttischträger *6*, in dem ein Schnellwechsler *7* für austauschbare Objekttische eingearbeitet ist, eine Einheit. Die Wechselfläche *5* an der Kondensorführung *4* mit Kondensortrieb *3* gestattet das Ansetzen von Kondensorträgern oder Kondensoren mit eigenem Träger. Der koaxial gelagerte Trieb *12* (s. Abschn. 4.1.2.) wirkt bei dieser Anordnung auf den Tubusträger *10* mit den Aufnahmen *8* und *9* für Objektivwechseleinrichtun-

gen und Tubusteile. Der Kondensortrieb kann beiderseitig bedient werden und ist ohne Werkzeug in der Gängigkeit einstellbar. Die Gewindebohrung *1* nimmt Filterhalter oder Beleuchtungsspiegel auf.
Ein weiteres Grundstativ dieser Baureihe (Bild 4.9) für Durchlicht- und Auflicht-Forschungsmikroskope besteht nur aus dem Stativfuß mit z. T. eingebauter Beleuchtungseinrichtung, dem Triebgehäuse *4* mit eingeschlossener Führung für die Fokussierbewegung, der Tubusträgeraufnahme *2*, einem weiteren Leuchtenanschluß *3* (im Bild nicht sichtbar) und dem bekannten koaxialen Trieb *5*. Dieser wirkt auf die Aufnahmeschwalbe *1*, die den Objekttisch direkt oder über einen Objekttischträger aufnimmt.
Es ist kein Zufall, daß die Funktionselemente dieses Stativs auf ein Minimum beschränkt sind. Der Umfang des Aufbaus solcher Stative ist reziprok zu ihrer Ausbaufähigkeit.
Stative, in denen ein Teil der objektabbildenden Optik eingebaut ist, sind Sonderausführungen und werden hier nicht erläutert.

Leuchten

Die Beleuchtungsverfahren und die Art der Objekte erfordern eine Anzahl Lichtquellen verschiedener Leistungen und unterschiedlicher spektraler Zusammensetzung. Neben Glühlampen haben hauptsächlich Quecksilber- und Xenon-Höchstdrucklampen Eingang in die Mikroskopie gefunden.
Für Einsteck-, Ansteck- und Einbauleuchten (Bild 4.10) werden Niedervoltglühlampen kleiner Leistung mit Stromversorgung von außen oder über eingebaute Vorschaltgeräte angewendet. Kleinere Mikroskope sind auch mit Leuchten ausgerüstet, deren Lampen direkt an das Netz angeschlossen werden. Glühlampen höherer Leistung und Höchstdrucklampen sind wegen der erheblichen Wärmeentwicklung in größeren Gehäusen untergebracht. Diese Gehäuse sind teilweise doppelwandig, damit sich die Außenwände nicht zu stark erwärmen. Eine entsprechende Lüftung verhindert den Wärmestau an der Lampe.
Leuchten mit Glühlampen höherer Leistung und Höchstdrucklampen werden nicht direkt an das Netz, sondern über Vorschaltgeräte angeschlossen. Der Stecker muß einen unmittelbaren Schutz gegen Fehlbedienung bieten. Mit einem zusätzlich angebrachten Hohlspiegel wird die Lichtleistung der Lampe besser genutzt. Fokussier- und Zentriereinrichtungen erlauben eine genaue Zuordnung des Spiegelbilds zur Lichtquelle.

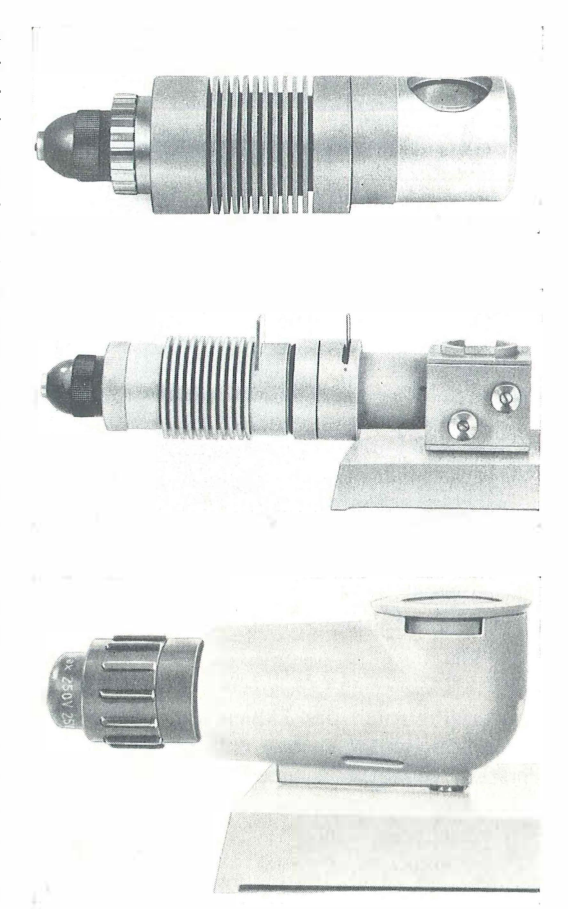


Bild 4.10. Ein- und Ansteckleuchten für Mikroskope
von oben nach unten: Einsteckleuchte, 6 V/15 W, Ansteckleuchte, 6 V/15 W, mit Beleuchtungseinrichtung nach dem Köhlerschen Prinzip; Ansteckleuchte mit Netzanschluß
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Für kurze Belichtungszeiten bei der Mikrofotografie sind Mikroblitzeinrichtungen geeignet. Eine Pilotlampe, die in einer zur Blitzröhre konjugierten Ebene angebracht ist, dient zum Einstellen der Beleuchtungseinrichtung und liefert das Licht zur Bildbeobachtung vor und nach einer Aufnahme mit dem Mikroblitz.
Die Kohlebogenleuchte, früher oft Bestandteil von Mikroskopausrüstungen, ist durch die Mikroskopierleuchte mit Höchstdrucklampe verdrängt worden.
Für die Filterung des Lichts stehen neben den eingebauten Filtern – in Leuchten und anderen Baueinheiten – einzelne Filter entsprechender Abmessung und Filtersätze zur Verfügung.

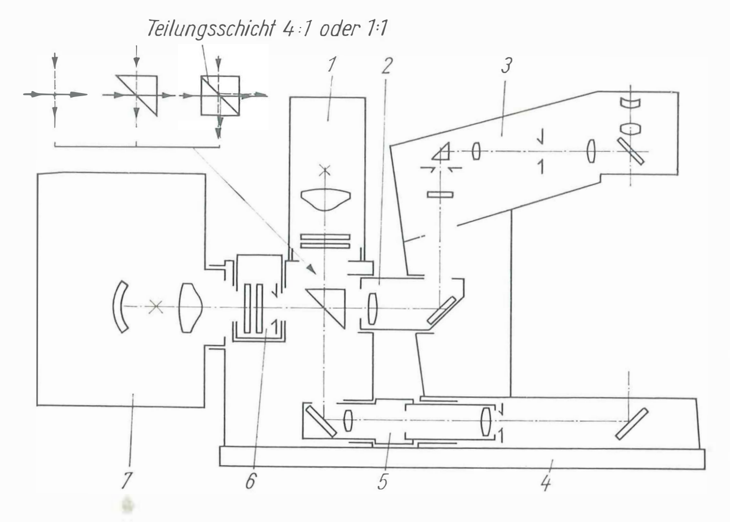


Bild 4.11
Beleuchtungseinrichtung für Mikroskope im Zusammenwirken mit einem Mikroskoptyp für Auf- und Durchlicht

Die Beleuchtungseinrichtung (Bild 4.11), fester oder integrierender Bestandteil von Mikroskopausrüstungen, gibt es für Durchlicht, Auflicht und kombinierte Beleuchtung. Im linken, oberen Teil des Bilds sind die Möglichkeiten der Strahlenführung dargestellt. Sowohl die starke Leuchte *7* als auch die schwache Leuchte *1* sind wechselbar. Austauschbare Filtermagazine mit verschiedenen Ausführungen der Leuchtfeldblende *6* und entsprechende Anpassungen *2* und *5* erlauben einen vielseitigen Einsatz. Das Mikroskop *3* – nur z.T. dargestellt – wird auf der Grundplatte *4* befestigt und bildet dann mit der Beleuchtungseinrichtung eine geschlossene Einheit.

Kondensorträger

Wechselbare Kondensorträger und eine Auswahl von Kondensoren gestatten vorteilhafte Kombinationen für eine Reihe von Arbeitsverfahren im Durchlicht. Ein vielseitig verwendbarer Kondensorträger (Bild 4.12) nimmt in einer Gewindebohrung unterschiedliche Hellfeldkondensoren auf. Die Aufnahme ist senkrecht zur optischen Achse justierbar, um mit dem eingesetzten Kondensor eine exakte zentrische Beleuchtung zu erzielen.

Die Ausleuchtung der großen Felder schwacher Objektive wird durch eine schiebbar befestigte Großfeldlinse erreicht. Sie wird dem Linsensystem des eingesetzten Kondensors zugeschaltet. Um besondere Effekte mit schiefer Beleuchtung zu erreichen, kann die Apertur-Irisblende bei einer weiteren Ausführung seitlich verschoben und um die optische Achse gedreht werden. An einer Teilung läßt sich der Betrag der Verschiebung ablesen. Die Nullage ist durch eine fühlbare Rast

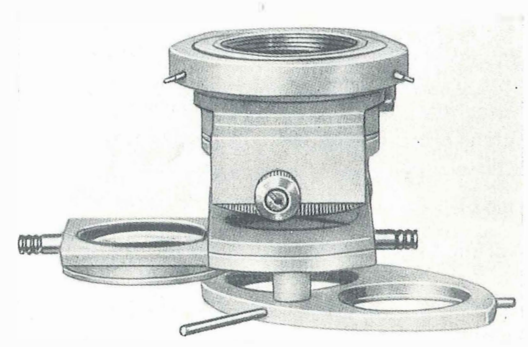
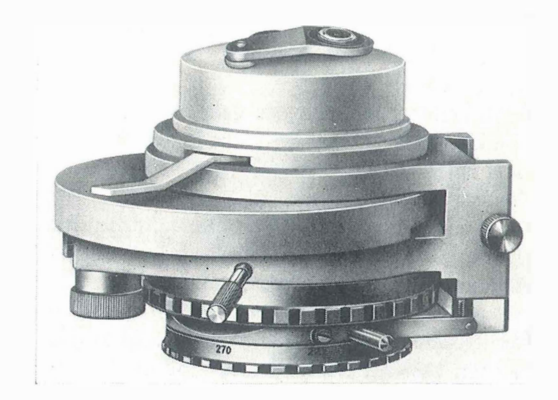


Bild 4.12. Kondensorträger mit seitlich verstellbarer Irisblende und schiebbarer Großfeldlinse
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Bild 4.13. Kondensor mit Träger. Aplanatisch-achromatischer Polarisationskondensor, die Frontlinse ist schaltbar, in der dingseitigen Brennebene können Blendenrevolver gewechselt werden
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



gekennzeichnet. Ein schwenkbarer Filterhalter zur Aufnahme von Lichtfiltern oder eines Filter-Polarisators vervollständigt diesen Kondensor. Für Routineuntersuchungen mit dauerndem Wechsel der einzelnen Einstellungen ist diese Ausführung besonders geeignet.

Kondensoren mit größerem räumlichem Aufbau (Bild 4.13) haben spezifische Träger, die in ihren Anschlüssen zu den Mikroskopstativen mit den analogen Anschlüssen der Kondensorträger übereinstimmen.

Tischträger

Bei geeignetem Gesamtaufbau des Mikroskops ist mit einem wechselbaren Tischträger, der in Richtung der optischen Achse in unterschiedlichen Höhen befestigt werden kann, die Vergrößerung des Fokussierbereichs indirekt möglich.

Die Aufnahme für austauschbare Objekttische kann fest oder zentrierbar sein. Die zentrierbare Aufnahme gestattet eine Zentrierung der drehbaren Objekttische zur optischen Achse des Mikroskops.

Objekttische

Auf die Objekttische (Bild 4.14) werden die Präparate aufgebracht und senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops bewegt. Diese Bewegung kann auf oder mit der Tischplatte erfolgen. Man unterscheidet zwischen festen Objekttischen, Drehtischen und Kreuztischen; letztere auch mit Drehmöglichkeit bis 360°. Auf den festen Objekttischen wird das Präparat von Hand verschoben. Zum Festklemmen des Präparats werden zwei Tischfedern mitgeliefert.

Mit dem aufsetzbaren Objektführer wird eine gleitende Kreuzverschiebung des Präparats auf der Tischplatte erzielt. Die Objektträgeraufnahme der aufsetzbaren Objektführer ist je nach Ausführung für sämtliche oder für eine Auswahl Objektträger der Hauptformate 28 mm × 48 mm, 50 mm × 50 mm, 26 mm × 76 mm und 52 mm × 76 mm ausgebildet.

Der Verschiebebereich des Präparats mit diesen Objektführern entspricht nicht in jedem Fall den maximalen Abmessungen des verwendbaren Objektträgers.

Drehtische für quantitative polarisationsoptische Untersuchungen weisen in beliebiger Winkelstellung einstellbare 45°-Rasten auf.

Mit den Kreuztischen wird die Tischplatte und damit das Präparat allseitig von Hand oder mit Trieben bewegt. Diese Triebe sind zur besseren

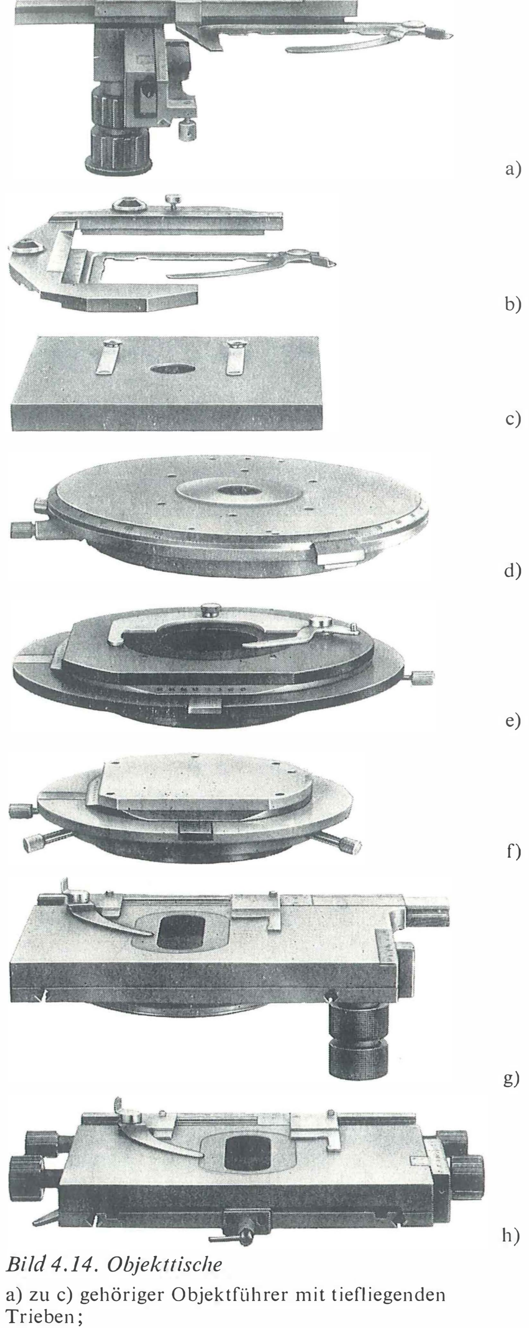


Bild 4.14. Objekttische

a) zu c) gehöriger Objektführer mit tiefliegenden Trieben;
b) der zu d) gehörige Objektführer;
c) fester Objekttisch;
d) Drehtisch für polarisationsoptische Untersuchungen;
e), f) Kreuztische (als Gleittische ausgebildet) für Durchlicht und Auflicht;
g) vereinfachter Kreuztisch mit tiefliegenden Trieben;
h) vereinfachter Kreuztisch mit Drehung
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Handhabung z.T. koaxial gelagert und vertikal angeordnet. Der Verschiebebereich ist in beiden Koordinaten meistens kleiner als 30 mm. Eine besondere Ausführung ist der Gleittisch, bei dem sich eine Platte, die zum Trägerteil nur über eine Fettschicht in Verbindung steht, mit einer Einstellgenauigkeit von 0,001 mm von Hand bewegen läßt. Ein derartiger Objekttisch ist preisgünstig und findet Anwendung, wenn ein systematisches Absuchen nicht erforderlich ist. Im vereinfachten Kreuztisch ist für die Verschiebung in der einen Richtung ein Objektführer eingebaut, in der anderen Richtung wird das Präparat mit der Tischplatte bewegt. Diese Anordnung bringt mit den gleichen äußeren Abmessungen des Kreuztisches einen Verschiebebereich, der dem größten Objektträger 52 mm × 76 mm entspricht.

Vielfach sind Teilungen mit Nonien zum Ablesen der Verschiebung und der Drehung angebracht. Mit definierten Anlageflächen für das Präparat ist damit auch das schnelle Wiederfinden bestimmter Präparatstellen möglich.

Die Objekttische sind entweder fest an den Stativen verschraubt oder auswechselbar in Objekttischträgern gelagert.

Mit Rücksicht auf eine einfache Bauart ist zur Gewährleistung einer zur optischen Achse zentrischen Drehung bei Kreuztischen das Verschiebeglied auf dem Drehlager aufgebaut. Infolgedessen laufen beim Drehen die Triebe mit um.

Ein Objektbewegungssystem – es läßt sich nicht an konventionelle Mikroskope ansetzen –, bei dem die Triebe für die Kreuzverschiebung während der Drehbewegungen nicht auswandern und eine zentrierte Objektdrehung in jeder Lage des Verschiebesystems durchgeführt werden kann, ist im Bild 4.15 als Prinzipskizze dargestellt. Eine Stahlplatte *5*, die das Präparat *4* aufnimmt, ist während der Kreuzbewegung auf dem Verschiebesystem *3* magnetisch geklemmt. Ein zweiter magnetisierbarer Ring *2*, der vertikal beweglich an dem zentrisch zur optischen Achse angeordneten Kugellager *1* befestigt ist, springt nach dem Aufmagnetisieren an die Stahlplatte. Automatisch löst sich mit einer geringen Verzögerung die Klemmung am inneren Magnetring. Die Stahlplatte und damit das Präparat gleiten während der Drehung über das Verschiebesystem und bleiben so beim Verschieben und beim Drehen praktisch in einer Ebene. Solche Objektbewegungssysteme sind für motorisierten Antrieb besonders geeignet.

Für das systematische Absuchen von Präparaten in Schritten kommen Objekttische mit Zusatzeinrichtungen oder Objekttischaufsätze zum Einsatz. Ein vereinfachter Kreuztisch (Bild 4.16a) ist z.B. mit Triebeinrichtungen ausgestattet, die eine Verschiebung des Präparats in beiden Koordinaten sowohl kontinuierlich als auch in festen Schritten erlauben. Beim schrittweisen Durchmustern ist eine Triebeinrichtung zwangsläufig gesperrt. Auf handelsüblichen Objekttischen, die dazu vorbereitet sind, kann der Integrationstisch (Bild 4.16b) der im Abschn. 9. beschriebenen elektrischen Integriereinrichtung ELTINOR des VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow, aufgesetzt werden.

Besondere Arbeitsmethoden verlangen weitere spezielle Ausführungen von Objekttischen, z.B. Universaldrehtische (Abschn. 6.1.4.) für polarisationsoptische Untersuchungen oder Heiz- und Kühltische (Abschn. 10.). Kugeltische, mit denen die Objektebene einer beliebig geformten Probe zur optischen Achse ausgerichtet werden kann, werden für schwächere Vergrößerungen – hauptsächlich in Verbindung mit Stereomikroskopen – angewendet. Ferner werden Probenhalterungen,

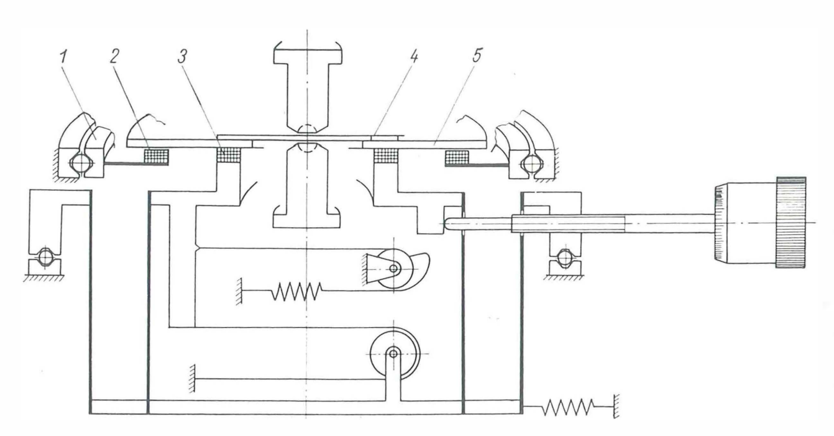
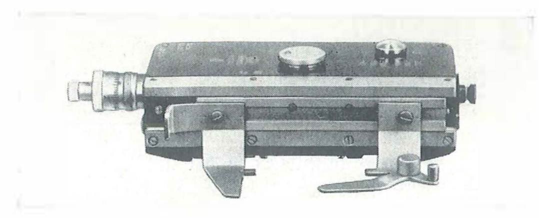
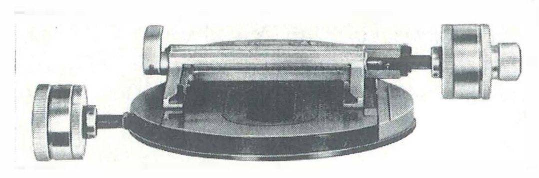


Bild 4.15
Objektbewegungssystem, bei dem während der Drehbewegung der Trieb nicht auswandert, wie es im Prinzip beim Kernspurmeßmikroskop KSM des VEB Carl Zeiss JENA ausgeführt wurde



a) vereinfachter Kreuztisch;



b) Integrationstisch als Objekttischaufsatz

Bild 4.16. Einrichtungen für schrittweise Objektverschiebung
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

feuchte Kammern für lebende Objekte und Schliffanlagen in verschiedenen Ausführungen als Objekttischaufsätze eingesetzt.
Für halb- und vollautomatisch arbeitende Mikroskope kommen Objekttische mit motorischen und elektromagnetischen Antrieben zur Anwendung. Der Antrieb kann in Schritten oder kontinuierlich erfolgen. Ein parallel angeordneter Handantrieb ist möglich.

Objektivwechseleinrichtungen

Das am Mikroskop einmal eingestellte Präparat wird meist bei verschiedenen Vergrößerungen beobachtet. Um das mühsame Ab- und Anschrauben der Objektive zu vermeiden, wurden Objektivwechseleinrichtungen entwickelt. Eine präzise mechanische Ausführung muß die Gewähr geben, daß beim Übergang von einem Objektiv zum anderen die Abweichung eines Bildpunkts in und senkrecht zur Richtung der optischen Achse minimal ist. Werden gut abgeglichene und zentrierte Objektive vorausgesetzt, muß ein vorher in die Sehfeldmitte eingestelltes Objekt beim Objektivwechsel im Sehfeld sichtbar bleiben.
Die bekannteste und am meisten angewendete Wechselvorrichtung ist der Objektivrevolver (Bild 4.17). Die Objektive werden eingeschraubt und lassen sich in beliebiger Drehrichtung schalten. Für Arbeiten, die eine genaue Zentrierung der Objektive im Strahlengang erfordern, ist es von Vorteil, die Objektivaufnahmen zentrierbar im Objektivrevolver anzuordnen. Unvermeidbare Fertigungstoleranzen des Objektivrevolvers und der mechanischen Fassung der Objektive lassen sich so ausgleichen. Ist bei einem derartigen Objektivrevolver eine Objektivaufnahme fest angeordnet, so legt das darin befestigte Objektiv die optische Achse des Mikroskops fest und ist die Basis für das Zentrieren der anderen am Revolver befindlichen Objektive.
Weitere Objektivwechseleinrichtungen sind Objektivschlitten und Zangenwechsler. Das Zentrieren der Objektive ist auch bei diesen Ausführungen möglich.

Tubusträger

Wechselbare Tubusträger, sie sind im Bild 4.18 mit Objektiven und Objektivwechseleinrichtungen dargestellt, ermöglichen das schnelle Umrüsten

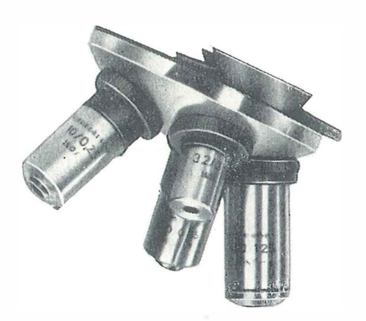
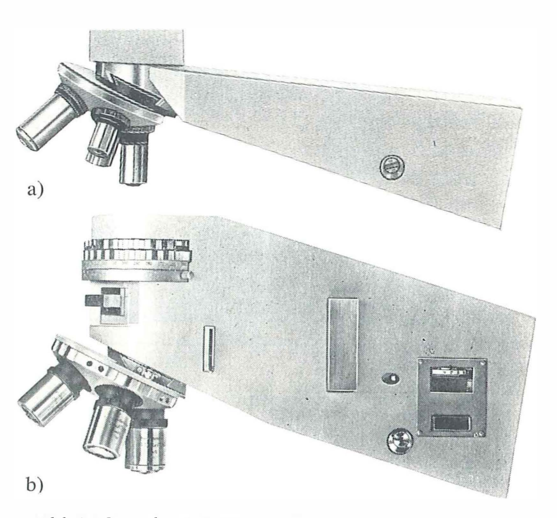


Bild 4.17. Objektivrevolver, mit Objektiven bestückt
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

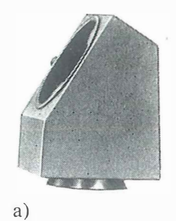


a)

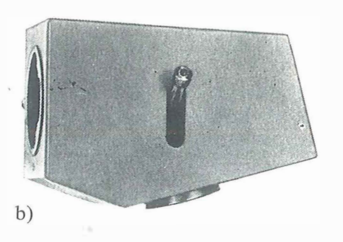
b)

Bild 4.18. Tubusträger
a) für Durchlicht;
b) für Durch- und Auflicht-Polarisation
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

des Mikroskops für die verschiedensten Arbeitsverfahren. Für ein konventionelles Durchlichtmikroskop ist der Aufbau eines solchen Tubusträgers recht einfach. An dem Gehäuse sind lediglich die Anschlüsse zum Stativ und zu den Tubusteilen.
Für Auflichtmikroskope sind in diesen Tubusträgern außer den Leuchten mit Kollektoren die Bauelemente für die Auflichtbeleuchtung – nach dem Köhlerschen Prinzip – eingeschlossen. Mit der gewählten Anordnung und der daraus resultierenden Lichtführung durch das Stativ ist eine geschlossene Form dieser Mikroskoptypen gewährleistet.



a)



b)

Bild 4.19

a) Winkeltubus, 30° (30° = Einblickwinkel gegen die Horizontale);
b) Winkeltubus, 15°, mit Zwischenbildebene und fokussierbarer Bertrand-Linse
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

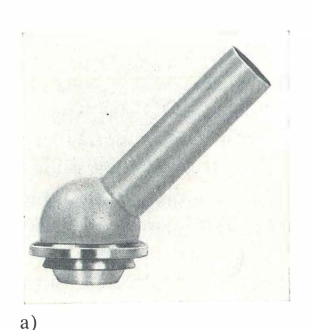
Tubusmittelteile – Zwischentuben

Mit einer weitgehenden Aufteilung des Tubus in einzelne Bausteine kann der Anwendungsbereich des Mikroskops wesentlich vergrößert werden. Zwischentuben ermöglichen Strahlenumlenkungen, Strahlenteilungen oder zusätzliche Verfahren.
Winkeltuben (Bild 4.19) – eine Form der Zwischentuben – lenken den Strahlengang des Mikroskops in eine dem Beobachter günstige Einblickrichtung, so daß einfache gerade Tubusoberteile – monokular oder binokular – zur Ausrüstung des Mikroskops verwendet werden können.
Zur Umlenkung verwendete Prismen oder Spiegel bewirken entweder keine Änderung der Bildlage oder vermitteln der Abbildung eine Wendung und Drehung, damit ein seitenrichtiges und aufrechtes Bild entsteht. Letzteres ist von Vorteil, wenn in der Objektebene nicht über Triebe, sondern mit der Hand direkt oder über eine Gleitführung manipuliert wird. Der Gleichlauf von Objekt- und Bildverschiebung erleichtert die Bedienung wesentlich.
Hat der Winkeltubus einen zusätzlichen Ausgang für mikrofotografische (oder andere) Einrichtungen, so spricht man von einem trinokularen Tubus, wenn für die visuelle Beobachtung ein binokularer Tubus verwendet wird (s. Abschn. 8.).
Zwischentuben mit Filteranalysatoren kommen in den verschiedensten Ausbaustufen vor, mit festen oder drehbaren Analysatoren und Aufnahmen für Kompensatoren und Lichtfilter. Im Wechsel mit dem Analysator einschaltbare Lichtfilter gewährleisten Blendschutz, wenn der Analysator während der Beobachtung ausgeschaltet wird.
Zur Untersuchung opaker Objekte läßt sich ein Auflichtilluminator in den Tubus einfügen, der nach den Regeln des Beleuchtungsverfahrens nach *Köhler* oder vereinfachten Beleuchtungsprinzipien aufgebaut sein kann.
Zwischentuben mit „pankratischem" System – auch unter der Bezeichnung „ZOOM-System" bekannt – ermöglichen den kontinuierlichen Übergang von einer Mikroskopvergrößerung zur anderen. „Pankratiktuben" erlauben die Umrüstung von Mikroskopen mit fester Okularvergrößerung in „ZOOM-Mikroskope".
Vergrößerungswechsel mit festen Stufen und bildseitig abbildende Einrichtungen für besondere Verfahren oder Kombinationen der in diesem Abschnitt genannten Zwischentuben ergänzen diese Bausteingruppe.

Tubusoberteile

Die visuelle Beobachtung am Mikroskop kann monokular, binokular oder über ein projiziertes Bild erfolgen. Tubusoberteile für monokulare und binokulare Beobachtung – man bezeichnet sie als Beobachtungstuben, als Einblicktuben oder ganz einfach als „Tuben" – nehmen die Okulare in eng tolerierten zylindrischen Bohrungen auf. In seltenen Fällen werden die Okulare in der Aufnahme geklemmt, sonst gewährleistet ihre Eigengewichtskraft eine sichere Lage auf dem Tubusrand.
Der Schrägtubus (Bild 4.20a) ist für eine bestimmte Einblickrichtung ausgelegt und wird in der Regel auf einer horizontalen oder vertikalen Fläche befestigt. Weit mehr Möglichkeiten bieten gerade Tuben, sie lassen sich über die verschiedensten Zwischentuben oder direkt an entsprechend geneigte Flächen des Mikroskopstativs ansetzen.
Monokulare Tuben sind für einfache Ausrüstungen und zur Projektion vorgesehen. Ein ausziehbarer Tubus (Bild 4.20b) erlaubt das Ändern der Tubuslänge für spezielle Meßzwecke oder zur

Kompensation sphärischer Abbildungsfehler beim Beobachten einer festen Ebene im Mikroskop.
In den binokularen Tuben müssen Strahlenteilung und Lichtführung der abbildenden Bündel so exakt sein, daß der Benutzer keinen Zwang bei der Beobachtung des mikroskopischen Bilds empfindet. Die zwanglose Beobachtung verlangt außerdem die Anpassung an den Augenabstand des Beobachters. Der Abstand der beiden Okularstutzen ist deshalb von 55 bis 75 mm einstellbar.
Beim binokularen Tubus (Bild 4.21) wird eine Abstandsänderung durch Drehen der beiden Gehäuseteile um die Achse des einfallenden Strahls erreicht. Es gibt andere Ausführungen, bei denen diese Einstellung durch diametrale Verschiebung der Okularstutzen erreicht wird. Die dabei auftretende Änderung der Tubuslänge muß ausgeglichen werden. Zur Korrektur eines unterschiedlichen Sehfehlers beider Augen ist ein Okularstutzen mit Dioptrieneinstellung versehen. Beiderseitiges Einstellen ist erforderlich, wenn auf eine feste Zwischenbildebene im Mikroskop zu fokussieren ist. An Teilungen lassen sich die Beträge der Verstellungen ablesen. Ein fest eingebauter Kompensator schaltet die polarisierende Wirkung des Strahlenteilersystems in einem binokularen Tubus für Polarisationsmikroskope aus.
Der Diskussionstubus – eine Anordnung von zwei gekoppelten Beobachtungstuben – erlaubt, das mikroskopische Bild zu zweit zu beobachten. Ein für beide Beobachter sichtbarer Zeiger dient der besseren Verständigung.
Ein Demonstrationstubus (Bild 4.22) bietet mehreren Personen gleichzeitig die Möglichkeit der Beobachtung. Besondere Beachtung verdient die Ausbaumöglichkeit des Demonstrationstubus für den Einsatz der Großformatmikrofotografie.


a)

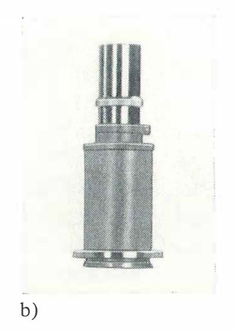

b)

Bild 4.20. Monokulare Tuben
a) monokularer Schrägtubus;
b) gerader Tubus, ausziehbar
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

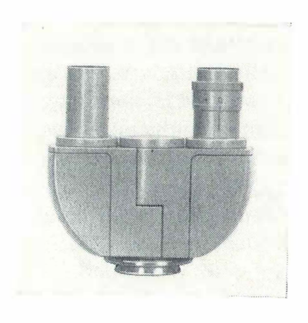


Bild 4.21
Binokularer gerader Tubus
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

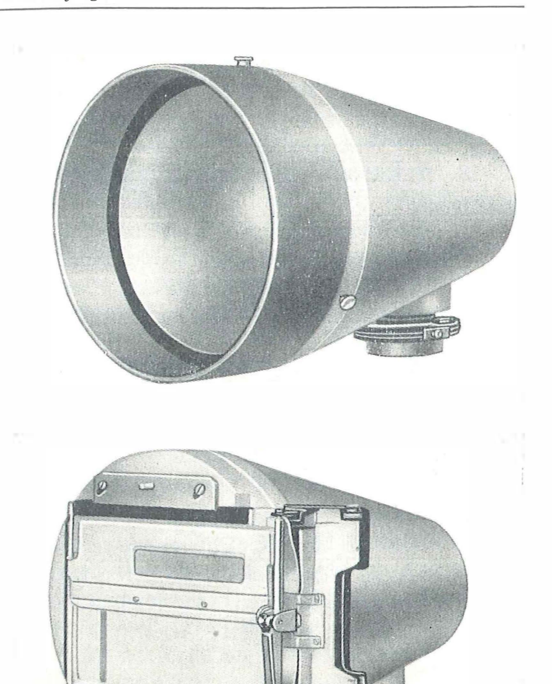


Bild 4.22. Demonstrationstubus
unten mit Fotoeinsatz für die Bildgröße 9 cm × 12 cm
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

4.4.2.
Koppelstellen der Bausteine

Voraussetzung für den Aufbau der Mikroskope aus Bausteinen sind sorgfältig ausgeführte Koppelglieder. Sie müssen Stabilität, genaue Lage der Bausteine und ein müheloses Aneinanderfügen garantieren. Die Möglichkeit versehentlicher und fahrlässiger Fehlbedienung muß

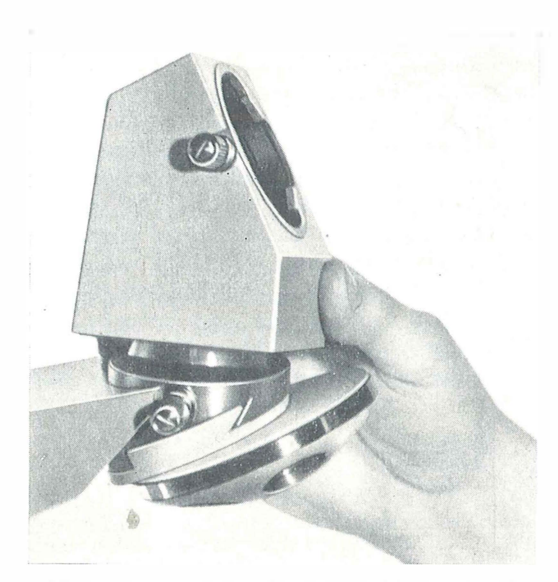


Bild 4.23. Ansetzen eines Bausteins mit Ringschwalbe
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

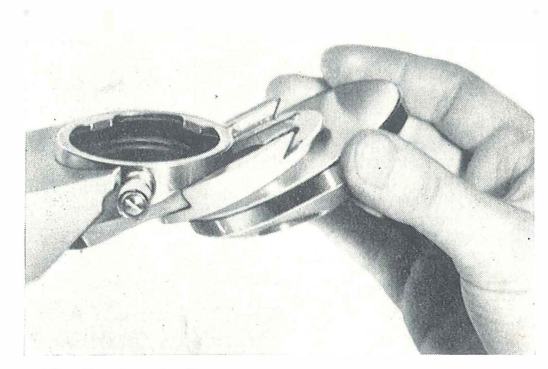
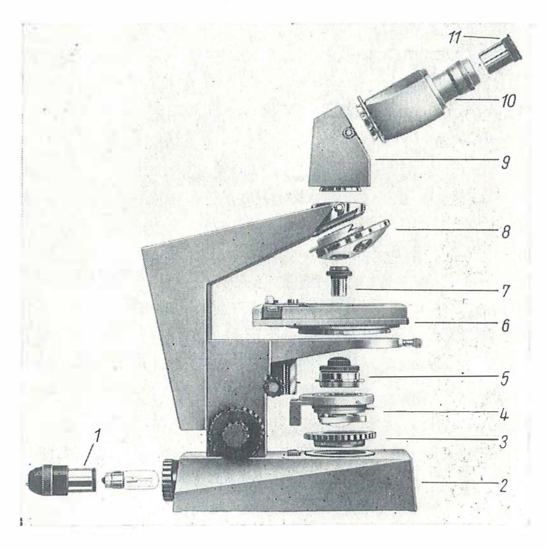


Bild 4.24. Wechsel eines Bausteins durch Schlittenführung
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

weitgehend ausgeschaltet sein und darf in keinem Fall zu einer Zerstörung der Bausteine führen.
Neben der einfachen Steckverbindung der Okulare und der Gewindebefestigung der Objektive gibt es im Gerätebau eine Reihe von Koppelgliedern, die vorstehende Forderungen erfüllen. Die Ringschwalbe in den verschiedensten Ausführungen und Abmessungen wird vielfach angewendet. Sie gewährleistet bei einfacher Herstellung eine exakte Mittenzentrierung. Wirkt die Klemme zum Befestigen der Ringschwalbe kraftschlüssig, erzielt man die Fixierung in jeder Drehlage. Eine formschlüssige Klemme – auch Stift und Nut in Ringschwalbe und Aufnahmeteil – erlaubt die Festlegung in einer oder mehreren Drehlagen. Ein Baustein mit Ringschwalbe wird gekippt in das Gegenteil eingeführt und erst dann aufgelegt (Bild 4.23). Der Wechsel durch Schlittenführung (Bild 4.24) – gleichgültig, ob mit trapezförmigem oder rechteckigem Querschnitt – läßt keine Drehung zu, gestattet aber eine geführte Längsverschiebung, gegebenenfalls über mehrere Raststellen. Eine sichere Halterung erreicht man dabei kraftschlüssig mit einer Feder oder kraft- und formschlüssig mit einer Klemme.
Bei Koppelgliedern ist z.T. mit der Aufnahme eine Zentriereinrichtung verbunden. Hat man nach dem ersten Einsetzen den Baustein zentriert, muß die Zentrierung beim nochmaligen Wechsel erhalten bleiben. Mit den vorstehenden Beispielen sind die Wechselmöglichkeiten bei weitem nicht erschöpft; es kommt aber für alle Wechsel mit Klemmeinrichtung – gleich welcher Art – zu den am Anfang stehenden Forderungen eine weitere hinzu: Beim Lösen der Klemme darf die zu wechselnde Einheit nicht ohne weiteres aus der Aufnahme fallen. Unbedachte Bedienung kann sonst zu einer Beschädigung oder Funktionsstörung des Mikroskops führen. Kommt nur gelegentliches Wechseln eines Bausteins vor, ist

Bild 4.25. Mikroskop ERGAVAL, für visuelle Beobachtung mit Hellfeldbeleuchtung ausgerüstet, gegliedert in die einzelnen Bausteine
1 Leuchte; *2* Stativ; *3* Filterhalter; *4* Kondensorträger; *5* Kondensor; *6* Objekttisch; *7* Objektiv; *8* Objektiv-Wechselvorrichtung (Tubusunterteil); *9* Zwischentubus (Tubusmittelteil); *10* Tubusoberteil („Tubus“); *11* Okular
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



eine abnehmbare Handhabe der Klemme von Vorteil, es sei denn, sie liegt an einer verdeckten Fläche oder in genügender Entfernung von den Einstelltrieben.

4.4.3. Anwendung der Bausteine

Aus den vielen möglichen Ausrüstungen, die sich aufgrund des Baukastensystems ergeben, sind einige Hersteller dazu übergegangen, ein bestimmtes Sortiment anzubieten und zur besseren Verständigung mit Interessenten und Käufern die Mikroskope ihrer Typenreihe systematisch zu bezeichnen.

Im Bild 4.25 ist das Mikroskop ERGAVAL, getrennt in einzelne Bausteine, dargestellt. Es ist das sowohl für Routine- als auch für Forschungsaufgaben geeignete Durchlichtmikroskop der MIKROVAL-Reihe und im Bild für visuelle Beobachtung mit Hellfeld ausgerüstet. Sind sämtliche Bausteine sorgfältig verbunden, was sich in kürzester Zeit mühelos erreichen läßt, ist ein Justierzustand erreicht, der allen Anforderungen genügt. Lediglich die Leuchte und der Kondensor sind in eine optimale Lage zu bringen. In welchem

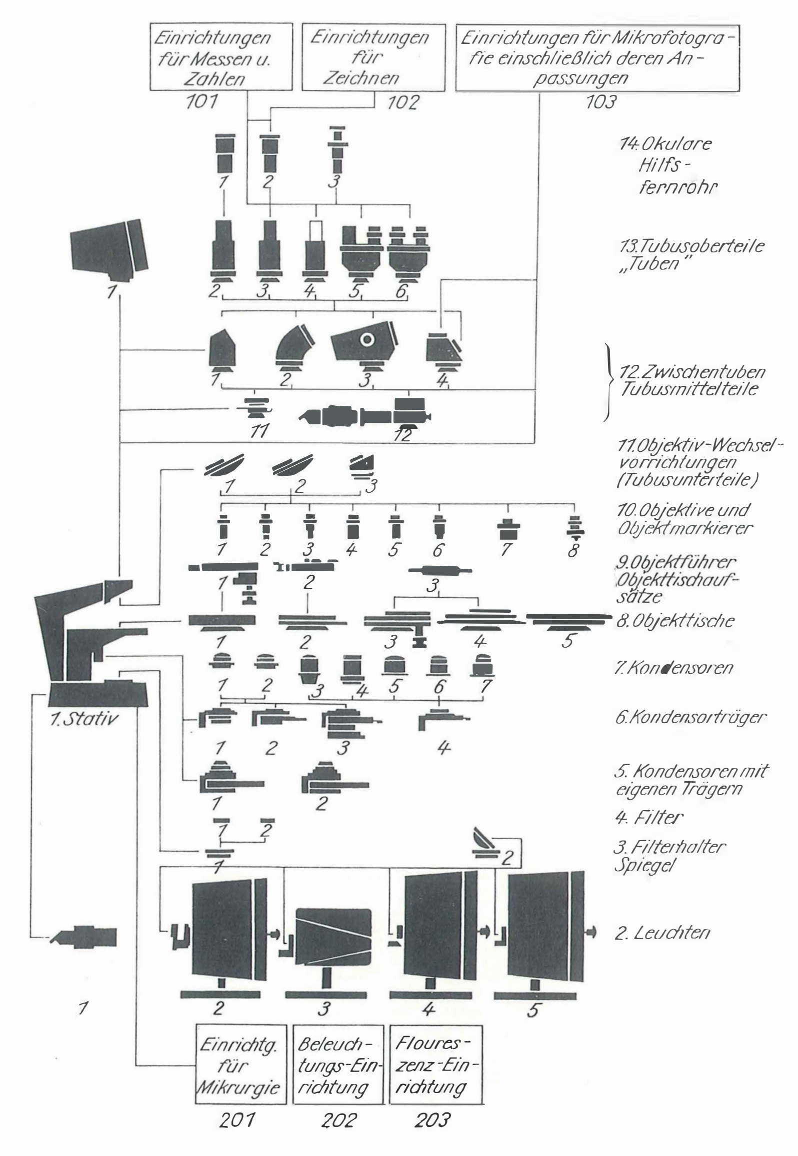


Bild 4.26. Das Stativ ERGAVAL in einer Übersicht mit den ansetzbaren Bausteinen und Einrichtungen

1 Stativ

2 Leuchten; *2.1* Einbauleuchte, 6 V/15 W; *2.2* Mikroskopierleuchte, 12 V/100 W; *2.3* Mikroskopierleuchte HBO 50; *2.4* Mikroskopierleuchte XBO 101; *2.5* Mikroskopierleuchte HBO 200

3 Filterhalter, Spiegel; *3.1* Filteraufnahme, 32 Dmr.; *3.2* Beleuchtungsspiegel

4 Filter; *4.1* Lichtfilter, 32 Dmr.; *4.2* Filter-Polarisator, 32 Dmr.

5 Kondensoren mit Träger; *5.1* Kondensor mit Ringblendenrevolver (für Achromate Phv); *5.2* Kondensor mit Ringblendenrevolver (für Planachromate Phv)

Umfang die einzelnen Bausteine durch gleichartige ersetzt oder weitere hinzugefügt werden können, ist schematisch im Bild 4.26 dargestellt. Die praktische Anwendung wird im Bild 4.27 gezeigt. Ein Vergleich der ausgerüsteten Mikroskope mit der schematischen Darstellung läßt erkennen, daß darin längst nicht alle Bausteine zur Anwendung kommen und weitere sinnvolle Kombinationen – z.B. ERGAVAL pankratik und ERGAVAL polarisation – möglich sind. Hinzu kommt das Variieren von Objektiven, Okularen und Kondensoren. Werden beim ERGAVAL durch das Austauschen oder Hinzufügen von Bausteinen im wesentlichen die Arbeitsmethoden verändert, so weist das Mikroskop AMPLIVAL (Bild 4.28) – es ist das Durchlicht-Forschungsmikroskop der MIKROVAL-Reihe – eine weit größere Wandlungsfähigkeit auf. Das Auswechseln des Tubusträgers ermöglicht bei einer geschlossenen Bauform den Aufbau von Durchlicht-, Auflicht-, Polarisations-, Interphako- und Fluoreszenzmikroskopen sowie Mikroskopen für Fotometrie, die höchsten Anforderungen genügen. Eine Auswahl ist im Bild 4.29 dargestellt. Auf die schematische Darstellung aller vorhandenen Bausteine für diesen Mikroskoptyp wird wegen des erheblich großen Umfangs verzichtet.

Mit dem wechselbaren Tischträger, der sich auf seiner Aufnahme in der Höhe verschieben läßt, erzielt man indirekt eine Vergrößerung des Fokussierbereiches, so daß höhere Objekte und größere Objekttischaufbauten möglich sind. Sämtliche Typen können außerdem mit vorhandenen Bausteinen für die Durchführung der verschiedensten Arbeitsmethoden – ebenso wie das Mikroskop ERGAVAL – ergänzt werden.

Mit diesen Beispielen ist die Anwendung der Bausteine bei weitem nicht erschöpft. Für die Ausrüstung von Universal-, Foto- und Spezialmikroskopen kommen sie in einem bedeutenden Umfang gleichfalls zum Einsatz.

Weitgehend trifft das auf ein Mikroskop zu, bei dem wechselweise oder kombinierte Anwendung von Durchlicht- und Auflichtverfahren bei gleichzeitiger Bildregistrierung im Vordergrund steht. Es ist das Universalforschungsmikroskop NU 2, das als festen Bestandteil eine mikrofotografische Einrichtung hat. Visuelle Beobachtung und Fotografie sind im Durch- und im Auflicht mit Hellfeld, Dunkelfeld, Phasenkontrast, Fluoreszenzanregung sowie im polarisierten Licht möglich, ferner kombinierte Verfahren mit Durchlicht- und Auflichtbeleuchtung einschließlich der Kombination Durchlicht–Phasenkontrast mit Auflicht-Fluoreszenz. Markant ist die Strahlenführung im Mikroskop (Bilder 4.30 bis 4.33). Ein „pankratisches" System gestattet einen stufenlosen Vergrößerungswechsel sowohl für die Mikroskopie als auch für die Mikrofotografie. Nach einer Strahlenteilung steht das Licht im Verhältnis 4:1 für das Bild in der Kamera und die visuelle Beobachtung zur Verfügung. Eine zur Film- oder Plattenebene konjugierte Formatplatte mit Einstellmarke erleichtert die fotografische Einstellung. Die Kamera ist stets aufnahmebereit. Soll das gesamte Licht zur Beobachtung dienen oder zur Kamera gelangen, wird das

---

6 Kondensorträger; *6.1* Kondensorträger mit Irisblende und Großfeldlinse; *6.2* Kondensorträger mit seitlich verstellbarer Irisblende; *6.3* Kondensorträger mit seitlich verschiebbarer Irisblende und schiebbarer Großfeldlinse; *6.4* Kondensorträger mit Schiebehülse

7 Kondensoren; *7.1* achromatischer Kondensor 1,2; *7.2* aplanatischer Kondensor 1,4; *7.3* aplanatisch-achromatischer Kondensor 1,4; *7.4* Präparier-Wechselkondensor; *7.5* Kardioid-Dunkelfeldkondensor; *7.6* Spiegelkondensor 0,4; *7.7* Spiegelkondensor 0,6

8 Objekttische; *8.1* fester Objekttisch; *8.2* Drehtisch; *8.3* vereinfachter Kreuztisch; *8.4* vereinfachter Kreuztisch mit Drehung; *8.5* Kreuztisch

9 Objektführer, Objekttischaufsätze; *9.1* Objektführer für feste Tische; *9.2* Objektführer für Drehtische; *9.3* feuchte Kammer

10 Objektivsätze, Objektmarkierer; *10.1* Achromate; *10.2* Planachromate; *10.3* Apochromate; *10.4* Planapochromate; *10.5* Achromate Phv; *10.6* Planachromate Phv; *10.7* Spiegelobjektive; *10.8* Objektmarkierer

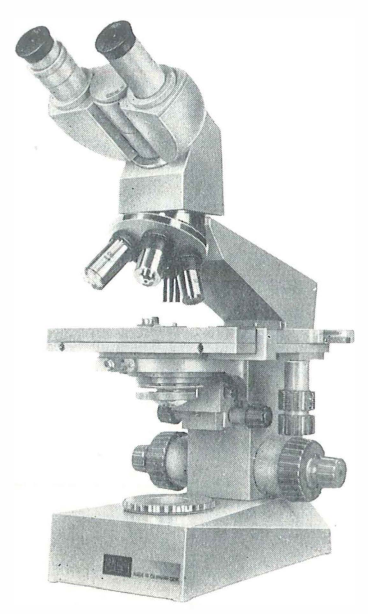
11 Objektivwechselvorrichtungen (Tubusunterteile); *11.1* Objektivrevolver mit fester Objektivaufnahme; *11.2* Objektivrevolver mit zentrierbarer Objektivaufnahme; *11.3* Anpassung mit Objektivschlitten

12 Zwischentuben (Tubusmittelteile); *12.1* Winkeltubus, 30°; *12.2* Winkeltubus, 15°, bildaufrichtend; *12.3* Pankratik-Tubus; *12.4* mikrofotografischer Wechseltubus (Grundteil des trinokularen Tubus); *12.11* Zwischentubus mit Filter-Analysator; *12.12* Auflichtilluminator

13 Tubusoberteile („Tuben"); *13.1* Demonstrationstubus; *13.2* gerader Tubus, Steck-Dmr. 30; *13.3* gerader Tubus, Steck-Dmr. 23,2; *13.4* gerader Tubus, ausziehbar; *13.5* binokularer gerader Tubus; *13.6* binokularer gerader Tubus, beide Okularstutzen stellbar

14 Okulare, Hilfsfernrohre; *14.1* Okulare, Steck-Dmr. 30, entsprechender Korrektion; *14.2* Okulare, Steck-Dmr. 23,2, entsprechender Korrektion; *14.3* Hilfsfernrohr

101 Einrichtung für Messen und Zählen
102 Einrichtung für Zeichnen
103 Einrichtungen für Mikrofotografie einschließlich deren Anpassungen
201 Einrichtung für Mikrurgie
202 Beleuchtungseinrichtung
203 Fluoreszenzeinrichtung



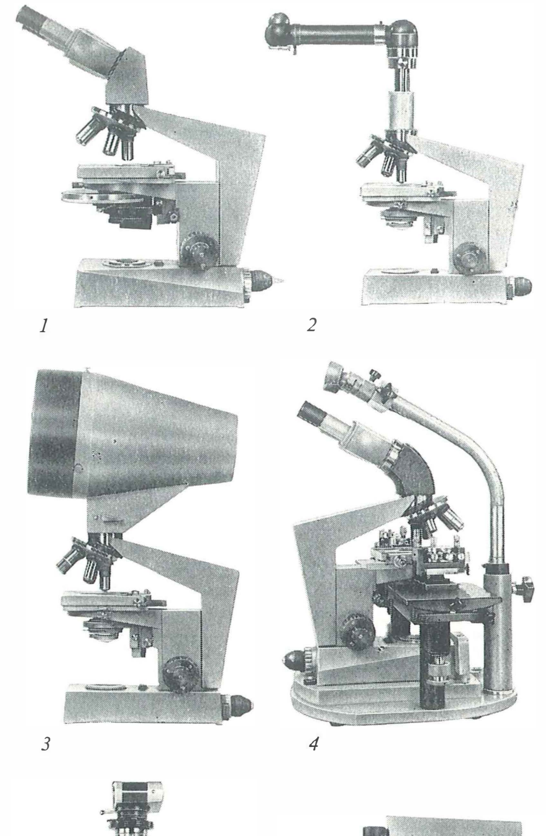
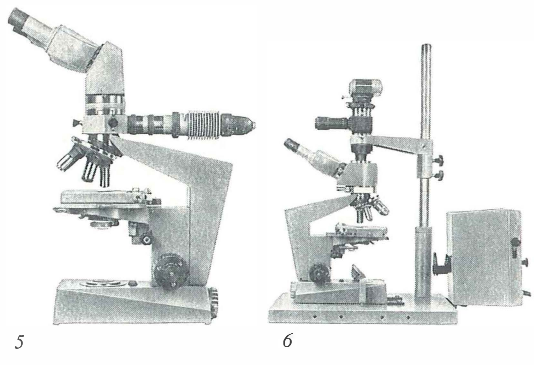
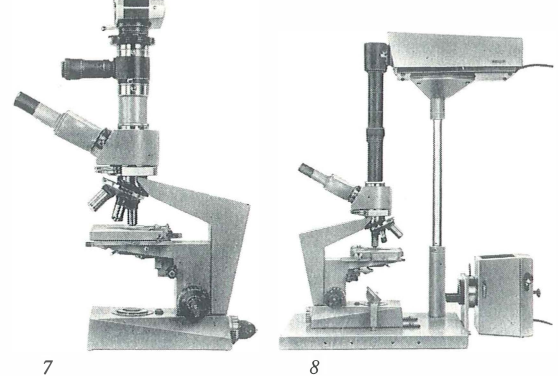


Bild 4.27. Mikroskop ERGAVAL, umschlossen von einer Auswahl Ausrüstungen, die sich aufgrund der gegliederten Bauweise ergeben

1 ERGAVAL phako; *2* Zeichnen; *3* Demonstration; *4* Mikrurgie; *5* Auflicht; *6* Fluoreszenz; *7* Mikrofotografie; *8* Fernsehen

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto





„pankratische“ System mit einem Handgriff ausgeschaltet. Erfordert das Untersuchungsverfahren möglichst wenig optische Systeme zwischen Objekt und Bild, kann man ebenso verfahren. Die Objektive für Durch- und Auflicht sind für „unendliche Tubuslänge“ korrigiert. Der telezentrische Raum zwischen Objektiv und Tubuslinse ist günstig für die Anordnung der Einheiten zur Polarisationsmikroskopie.

Der untere Teil des Stativs enthält die erforderlichen optischen Glieder für die Durch- und Auflichtbeleuchtung nach dem Köhlerschen Prinzip. Im Durchlicht-Hellfeld kann mit dem Beleuchtungssystem des „pankratischen“ Kondensors die numerische Apertur der Beleuchtung über einen Einstellring leicht dem verwendeten Objektiv optimal angepaßt werden. Drei Leuchten mit spektral unterschiedlichen Lichtquellen sind an der Grundplatte des Stativs befestigt und lassen sich wahlweise über ein Prismensystem in den Strahlengang einschalten sowie in ihrer Helligkeit regeln. Diese Leuchten sind sowohl für Durch- als auch für Auflicht bestimmt und mit einer einfachen Umschaltung einsatzbereit. Das

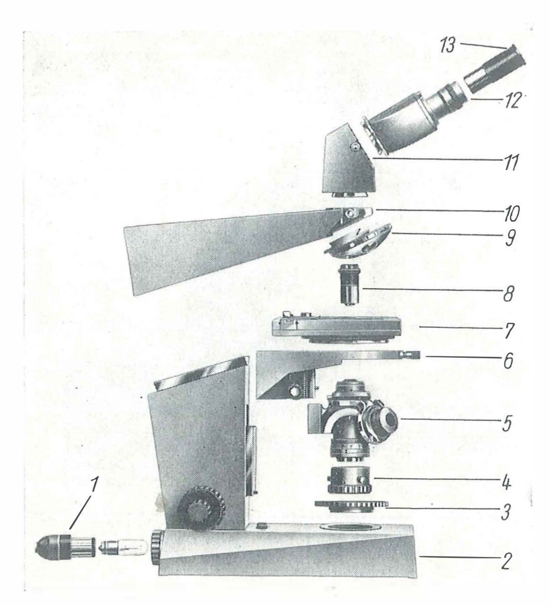
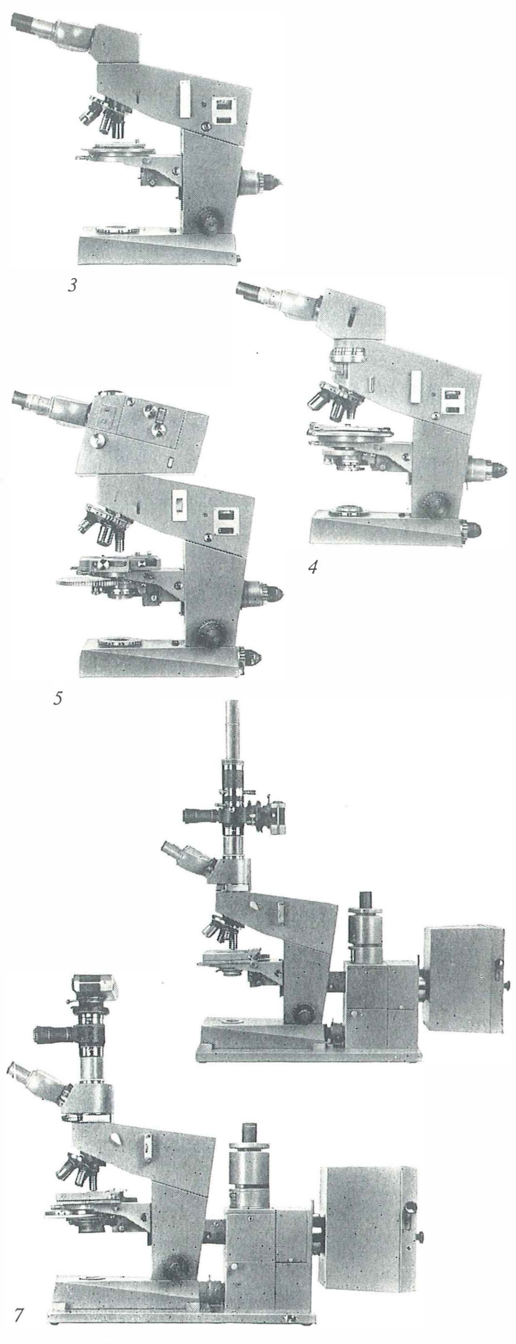


Bild 4.28. Mikroskop AMPLIVAL, für visuelle Beobachtung bei Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung ausgerüstet, gegliedert in die einzelnen Bausteine

1 Leuchte; *2* Stativ; *3* Filterhalter; *4* Aperturblende (zum Kondensor); *5* Kondensor mit Träger; *6* Objekttischträger; *7* Objekttisch; *8* Objektiv; *9* Objektiv-Wechselvorrichtung (Tubusunterteil); *10* Tubusträger; *11* Zwischentubus (Tubusmittelteil); *12* Tubusoberteil („Tubus"); *13* Okular

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



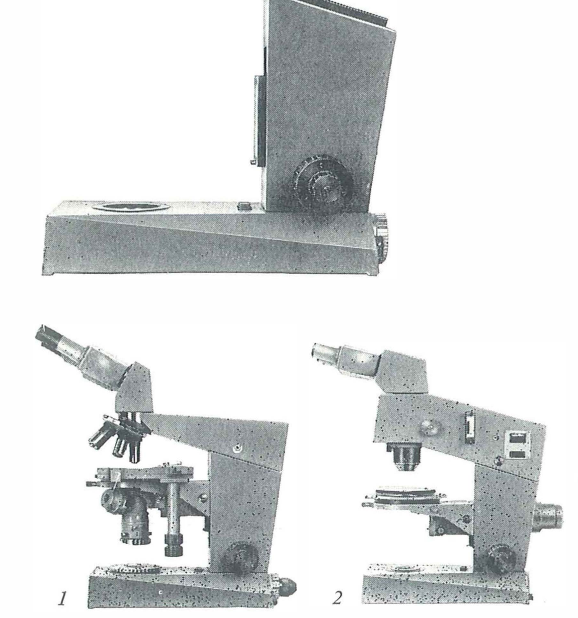


Bild 4.29. Eine Auswahl von Mikroskopen für unterschiedliche Mikroskopierverfahren, die auf ein Stativ für Durchlicht- und Auflicht-Forschungsmikroskope aufgebaut sind

1 AMPLIVAL; *2* VERTIVAL; *3* EPIVAL; *4* AMPLIVAL pol. u; *5* AMPLIVAL interphako; *6* AMPLIVAL photometric; *7* FLUOVAL

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

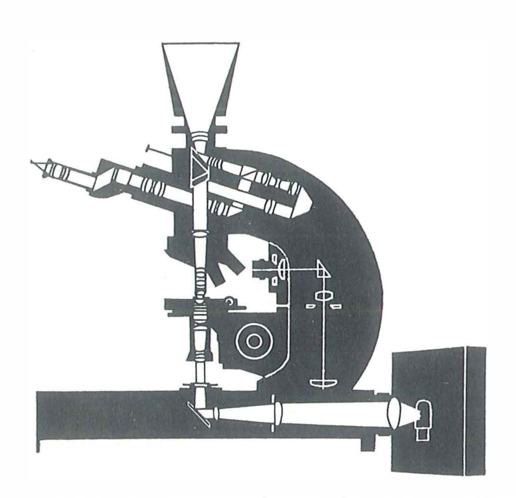


Bild 4.30. Universalforschungsmikroskop NU 2 des VEB Carl Zeiss JENA

Durchlicht-Hellfeld mit pankratischem Strahlengang für Beleuchtung, Beobachtung und Fotografie

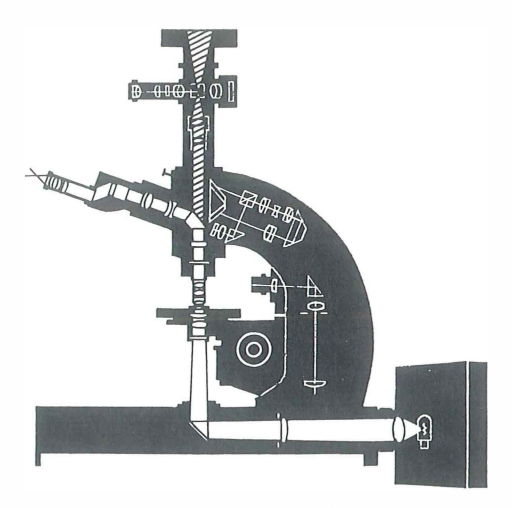


Bild 4.32. Universalforschungsmikroskop NU 2

durchfallendes polarisiertes Licht im direkten Strahlengang

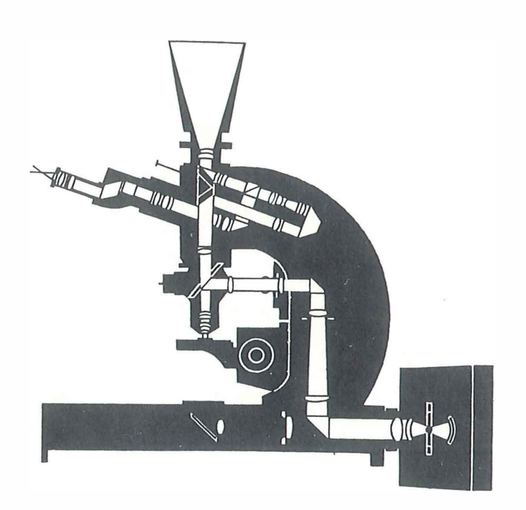


Bild 4.31. Universalforschungsmikroskop NU 2

Auflicht-Hellfeld mit pankratischem Strahlengang für Beobachtung und Fotografie

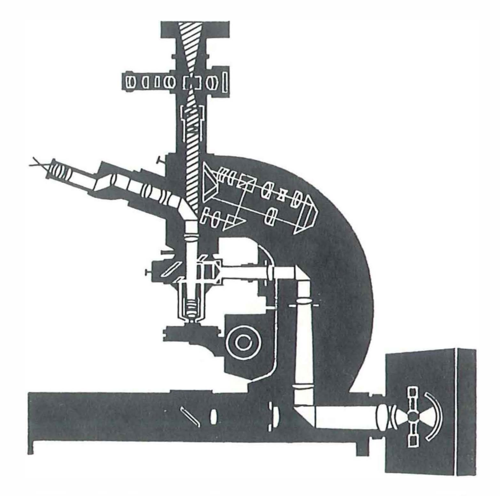


Bild 4.33. Universalforschungsmikroskop NU 2

Auflicht-Dunkelfeld im direkten Strahlengang

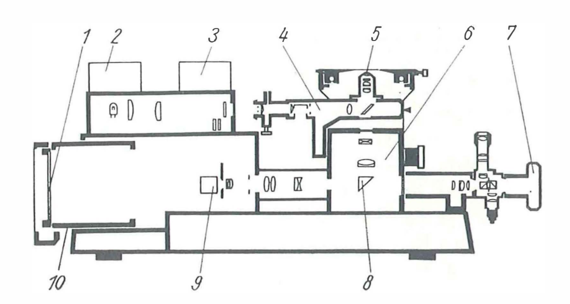


Bild 4.34. Großes Auflicht-Kameramikroskop NEOPHOT 2

Aufbauschema

Mikroskop ist schwingungsgedämpft auf einem besonderen Arbeitstisch aufgebaut, in dem sich die elektrischen Vorschaltgeräte und Schubfächer für das umfangreiche Zubehör befinden.

4.5. Mikroskope umgekehrter Bauart

4.5.1. Auflichtmikroskop umgekehrter Bauart

In Wissenschaft und Praxis hat sich für Auflichtmikroskope die umgekehrte Form nach *Le Chatelier* bewährt. Der Objekttisch liegt bei diesem Mikroskoptyp über dem Objektiv. Das Präparat wird mit der zu untersuchenden Fläche auf den Objekttisch gelegt und ist ohne weitere Hilfsmittel zur optischen Achse ausgerichtet. Aus der großen Anzahl solcher Auflichtmikroskope sei in folgendem der wesentliche Aufbau eines umfangreichen und leistungsstarken Kameramikroskops, des NEOPHOT 2, beschrieben (Bild 4.34). Es ist ein Mikroskop liegender Bauart, d.h., die Einheiten zur Bildregistrierung sind horizontal zum Mikroskop angeordnet. Neben der geschlossenen Bauart bietet eine solche Ausführung dem Benutzer die Möglichkeit, ohne Mühe vom Sitzplatz aus sämtliche Einrichtungen zu bedienen.

Zwei Leuchten *2* und *3* mit Lichtquellen unterschiedlicher Intensität sind Grundbestandteile der Ausrüstung. Die Beleuchtungseinrichtung – Illuminator *4* – ist wechselbar und entspricht in ihrem Aufbau den Beleuchtungseinrichtungen der Mikroskope aufrechter Bauart.

Die Objektive *5* sind auf „unendliche Bildweite“ korrigiert. Anstelle einer festen Tubuslinse ist ein fünfstufiger Vergrößerungswechsler *6* eingebaut, so daß der Okularwechsel entfällt.

Die Prismenkombination zum visuellen Einblick – im Schema nicht dargestellt – gewährleistet ein bewegungsrichtiges Bild. Das schaltbare Prisma *8* unter dem Vergrößerungswechsler bewirkt je nach seiner Stellung die Ablenkung des Strahlengangs zu den Einheiten der Kleinbild-Mikrofotografie *7* (s. Abschn. 8.2.4.) oder zu der Einrichtung für die Mikrofotografie im Großformat *1*. Über ein weiteres Prisma kann der Strahlengang zu einer Projektionsmattscheibe mit Fresnellinse geleitet werden. Sowohl für den Einzelbeobachter, der vor dem Gerät sitzt, als auch für mehrere Beobachter, die bis zu 2 m von der Projektionsscheibe entfernt sein können, bewirkt die Fresnellinse eine gleichmäßig ausgeleuchtete Fläche. Die Plattenebene der Großformatkamera 13 cm × 18 cm ist in Nullstellung zur Ebene der Projektionsmattscheibe konjugiert. Für diese Stellung ergeben sich die standardisierten Vergrößerungsstufen. Wenn in Sonderfällen von diesen Stufen abgewichen werden muß – formatfüllendes Bild oder bestimmte Vergrößerungen –, ist der Kameraauszug *10* so bemessen, daß sich jeder beliebige Abbildungsmaßstab zwischen zwei Vergrößerungsstufen einstellen läßt. Zum Einstellen des Bilds mit der Lupe ist die Projektionsmattscheibe gegen eine Klarglasscheibe austauschbar. Der Verschluß der Großformatkamera wird von einer Fotozelle über eine Belichtungsautomatik gesteuert. Zum Scharfstellen in der Plattenebene kann man den Verschluß von Hand öffnen und schließen.

Für die Fokussierung auf das Objekt genügt die Feinverstellung, da sich bei diesem Mikroskoptyp die Objektebene kaum ändert. Zum Wechseln der Objektive wird der Objekttisch mit einem einzigen Hebeldruck angehoben. Den Rücklauf bremst ein Hemmwerk ab. Das Objekt befindet sich nach dem Rücklauf so nahe der Einstellebene, daß sein Bild zu erkennen ist. Eine vorhandene Grobeinstellung wird nur verwendet, wenn Einrichtungen zwischen Objektivanschraubfläche und Objektebene zum Einsatz kommen, die nicht der normalen Abgleichlänge der Objektive von 45 mm entsprechen.

Das gesamte Mikroskop ist schwingungsgedämpft auf einem Arbeitstisch gelagert, der die elektrischen Vorschaltgeräte – einschließlich der häufig zu benutzenden Bedienungselemente für die Leuchten und Belichtungsautomatik – und das Zubehör aufnimmt.

4.5.2. Durchlichtmikroskop umgekehrter Bauart

Bestimmte Arbeitsgebiete fordern für die Beobachtung mit durchfallendem Licht ebenfalls die umgekehrte Bauart des Mikroskops. Sie erlaubt das Aufsetzen von Gefäßen beliebiger Abmessungen auf den Objekttisch. Da sich die Objektive unter dem Objekttisch befinden, kann man durch den Boden dieser Gefäße auf dem Grunde wachsende Kulturen, Sedimente und chemische Reaktionen beobachten. Im Bild 4.35 wird ein derartiges Mikroskop gezeigt. Für die optische Ausrüstung wird das Zubehör eines Forschungsmikroskops aufrechter Bauart benutzt. Damit sind die Beleuchtungsverfahren Hellfeld, Dunkel-

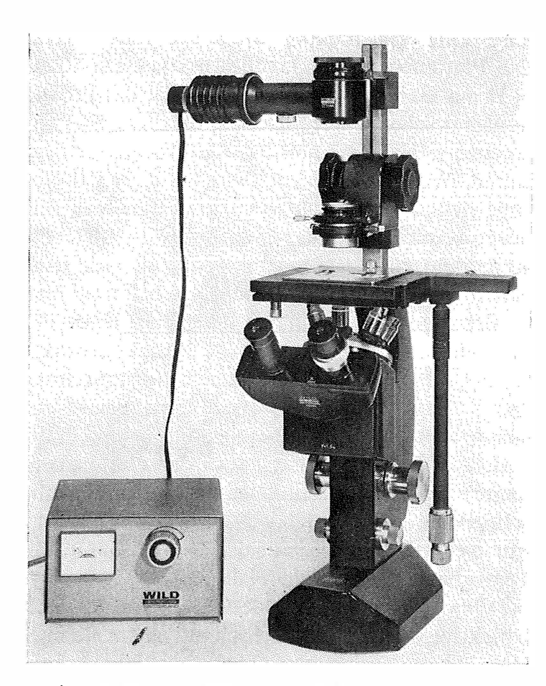
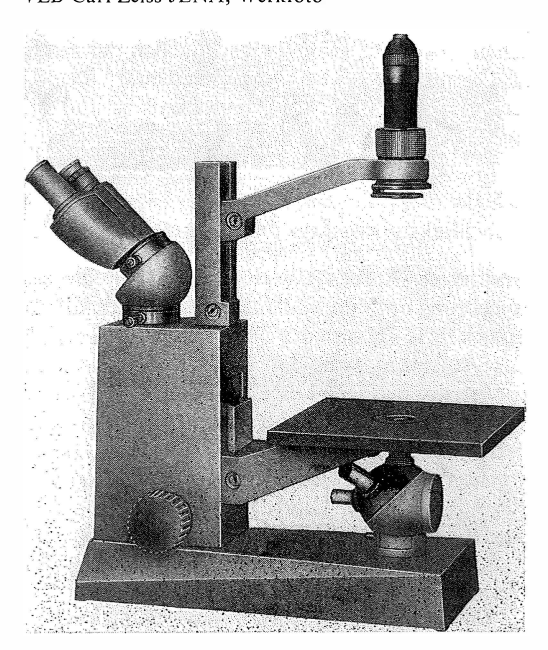


Bild 4.35. Umgekehrtes biologisches Mikroskop M 40
Firma Wild, Heerbrugg, Schweiz, Werkfoto

Bild 4.36. Durchlichtmikroskop umgekehrter Bauart TELAVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



feld, Phasenkontrast und Polarisation sowie Projektion, Mikrofotografie und Mikrokinematografie möglich. Für die Planktonforschung steht ein sinnvolles Behältersystem zur Verfügung. Das Mikroskop wird von der offenen Seite bedient. Dieser Aufbau bedingt einen hochliegenden Objekttisch. Für eine bequeme Bedienung sind die Triebgestänge weit nach unten gezogen und lassen sich nach allen Richtungen bewegen.
Ein kleines Mikroskop dieser Bauart für schwache bis mittlere Vergrößerungen mit Durchlicht-Hellfeld-Beleuchtung, bei dem auf einen tiefliegenden Objekttisch Wert gelegt wurde, wird im Bild 4.36 gezeigt. Die objektabbildenden Strahlen werden durch den Fuß und das Triebgehäuse zum visuellen Einblick geführt, der im Bedarfsfall gegen Einrichtungen für die Mikrofotografie austauschbar ist. Das Bild ist aufrecht und seitenrichtig. Für Untersuchungen mit auffallendem Licht läßt sich ein Auflichtilluminator mit Planglas und Filteraufnahme unter dem Objektivrevolver einsetzen. Einfache Untersuchungen mit polarisiertem Licht sind für beide Beleuchtungsverfahren möglich. Die Verwendbarkeit starker Lichtquellen gestattet auch Fluoreszenzmikroskopie. Okular-Zählfeldplatten zur Bestimmung der Teilchenzahl je bestimmte Fläche stehen zur Verfügung.

4.6. Sondermikroskope

Über Wirkungsweise und Aufbau von Mikroskopen für bestimmte Verfahren, über Projektionsmikroskope und Stereomikroskope wird in den Abschnitten 6., 7. und 8. ausführlich berichtet. Es gibt aber eine ansehnliche Reihe weiterer Typen, die für spezielle Arbeitsvorhaben aufgebaut und ausgerüstet sind.

Kleinmikroskope (Einzweckmikroskope)

Hauptsächlich für Schulen und andere Lehranstalten werden kleine Durchlichtmikroskope gefertigt, die bei guten optischen Leistungen einfach zu handhaben sind. In ihrem Aufbau kommen sie dem klassischen zusammengesetzten Mikroskop sehr nahe. Die Anwendung beschränkt sich auf Hellfeldbeleuchtung; gewechselt werden nur Objektive und Okulare. Diesem Mikroskoptyp entspricht das Kleinmikroskop C des VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow (Bild 4.37). Visuelle Beobachtung ist in einem Vergrößerungsbereich von 50- bis 100fach und 125-

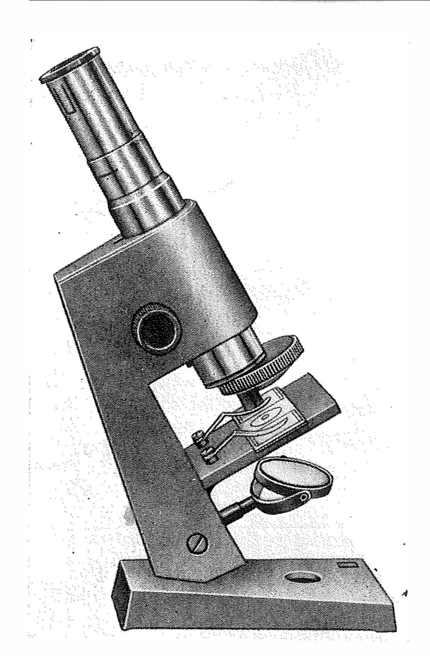


Bild 4.37. Kleinmikroskop C
VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow, Werkfoto

bis 225fach möglich. Dafür sind zwei Objektive auf einem Revolver fest angeordnet. Der Vergrößerungswechsel innerhalb der beiden Bereiche erfolgt durch Tubusauszug. Zur Fokussierung wird der Tubus mit einem Trieb bewegt.
An eine Projektionsleuchte angeschlossen, läßt sich dieser Typ in einen Projektor umwandeln und zum Nachzeichnen der vom Mikroskop entworfenen Bilder verwenden.
Verzichtet man auf das „Klein" bei solchen Ausführungen, können Einzweckmikroskope für jedes Mikroskopierverfahren und jede Arbeitsmethode mit höchster Leistungsfähigkeit hergestellt werden.

Technische Mikroskope

Metallografische Untersuchungen großer und schwerer Werkstücke ohne Entnahme einer Werkstoffprobe stellen besondere Anforderungen an den Aufbau der Mikroskope. Ist der Transport eines Prüflings zum Prüflabor zu umständlich, empfiehlt sich ein kleines transportables Mikroskop, das sich an Ort und Stelle auf das Objekt setzen läßt.
Stationäre Metallmikroskope sind äußerst stabil aufgebaut, um große und schwere Präparate aufnehmen zu können. Zur Untersuchung kleiner Präparate stehen für diese Mikroskope geeignete Untersätze mit speziellen Halterungen zur Verfügung.
Der Vergrößerungsbereich umfaßt die in der Metallmikroskopie üblichen Vergrößerungen 50×, 100×, 200×, 500× und 1000×. In der mechanischen Ausführung und der optischen Leistung entsprechen diese Mikroskope konventionellen Typen.

Meßmikroskope

Im allgemeinen werden Meßmikroskope für Längen- und Winkelmessungen sowie für Formvergleiche mit vorgezeichneten Profilen und Unterschiedsmessungen mit Feinzeigern eingesetzt. Die gewonnenen Werte dienen zur Bestimmung der geometrischen Formen der untersuchten Objekte. Während die kleineren Werkstattmikroskope im auffallenden Licht arbeiten, sind die größeren Typen für Durch- und Auflichtbeleuchtung eingerichtet. Nur in geringem Umfang werden mit Meßmikroskopen metallografische Untersuchungen an natürlichen Präparaten und Anschliffen sowie Strukturuntersuchungen an beliebigen Objekten mit Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung durchgeführt.

Mikroskope zur Untersuchung hochradioaktiver (oder giftiger) Substanzen

Mikroskopische Untersuchungen an radioaktiven Metallen und deren Wirkung auf andere Substanzen erfordern einen Mikroskopaufbau, der sich über zwei Räume erstreckt. Der Objekttisch mit der strahlenden Probe und die Objektive befinden sich innerhalb einer abgeschirmten Schutzkammer. Die mechanischen Antriebe, Steuerpult für die Einstellung, Einblicktuben, Beleuchtungs- und Fotoeinrichtung liegen außerhalb der Kammer. Die Mikroskope für dieses Arbeitsgebiet werden von handelsüblichen, ausbaufähigen Mikroskopen abgeleitet, so daß die bekannten Mikroskopierverfahren angewendet werden können.

Mikroskope mit Meßwerteinspiegelung

Rationelle Arbeitsmethoden oder die fotografische Registrierung von zu einem bestimmten Objektzustand gehörenden Meßwerten (s. Abschn. 10.1.3.5.) erfordern gelegentlich das Einspiegeln von Skalen oder Markierungen in die Bildebene des Mikroskops. Die Abbildung kann über Nebenstrahlengänge erfolgen, die dem objektabbildenden Strahlengang überlagert mitgeführt werden oder beides in einen Strahlengang vereinigen. Das optische Schema des Kernspurmeßmikroskops (s. Abschn. 6.1.8.) des VEB Carl Zeiss

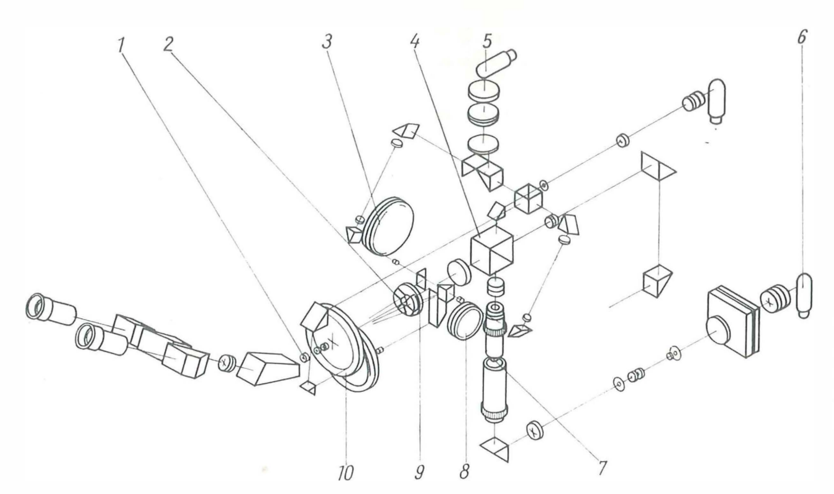


Bild 4.38. Kernspurmeß-mikroskop KSM
optisches Schema (mit Meßwerteinspiegelung in die Bildebene des Mikroskops)
VEB Carl Zeiss JENA

JENA (Bild 4.38) zeigt die drei Möglichkeiten. Drei Meßskalen *3*, *8* und *10* werden über Nebenstrahlengänge abgebildet. Die Zwischenbilder der einzelnen Skalenausschnitte liegen in einer besonderen Ebene *9* ringförmig um den objektabbildenden Strahlengang und werden von einem schaltbaren Linsensystem *1* in die Okulardingebene abgebildet. Gekoppelt mit dem Linsensystem, werden die Lichtquellen für Skalenbeleuchtung *5* und Objektbeleuchtung *6* entsprechend geschaltet. Es ist dann entweder das Skalen- oder das Objektbild zu sehen. Von Vorteil ist eine solche Anordnung, wenn Meßwerte ähnlichen Betrags zu erwarten sind. Der Beobachter wird bei der Einstellung auf das Objekt *7* durch das Skalenbild nicht beeinflußt. Linsensegmente *2* in der Zwischenbildebene sorgen für eine Pupillenabbildung der drei Nebenstrahlengänge am Ort der Austrittspupille des objektabbildenden Strahlengangs. Mit der Einführung von beweglichen Lichtleitern für Beleuchtung und Abbildung lassen sich ähnlich liegende Aufgaben ebenso lösen. Ein Strahlengang für eine interferometrische Kontrolleinrichtung wird über den Teilungswürfel *4* in den objektabbildenden Strahlengang eingespiegelt.

Vergleichsmikroskop

Vorwiegend in der Kriminalistik, doch auch für technische und wissenschaftliche Aufgaben wird das Vergleichsmikroskop eingesetzt. Der Aufbau eines solchen Mikroskops erlaubt sowohl den Vergleich verschiedener Objekte mit gleicher optischer Ausrüstung als auch den Vergleich verschiedener Beleuchtungsverfahren am gleichen Objekt. Ebenso können Objektive oder Okulare verglichen werden. Die Bilder der Objekte erscheinen nebeneinander – durch besondere Einrichtungen auch übereinander – im Sehfeld.

Das kriminalistische Vergleichsmikroskop der Firma Leitz, Wetzlar (BRD), besteht aus zwei Mikroskopausrüstungen für Untersuchungen im Durch- und im Auflicht, die nebeneinander auf einem gemeinsamen Grundgestell aufgebaut und über einen Vergleichstubus verbunden sind. Eine fotografische Einrichtung ist Grundbestandteil der Ausrüstung. Ergänzungseinheiten für Geschoß- und Patronenhülsenuntersuchungen sowie Vergleichsuntersuchungen von Präparaten bis zu einer Größe von 150 mm × 100 mm stehen zur Verfügung.

Diese vergleichenden Untersuchungen können auch mit einem Vergleichstubus, der zwei mit monokularen Tuben ausgerüstete gleichartige Mikroskope verbindet, durchgeführt werden.

Mikroskope für quantitative Mikroskopie

Verfahren der quantitativen Mikroskopie, wo Meßgrößen auftreten, die z.T. kleiner als 1 μm sind, erfordern Mikroskope mit höchster mechanischer und thermischer Stabilität. Mikroskope, bei denen wegen der günstigen Handhabung drei Seiten des Präparats zugänglich sind, genügen nur mit Einschränkungen diesen Anforderungen. Um die höchste Stabilität zu gewährleisten, wählen die Konstrukteure den Brücken- oder allseitig symmetrischen Aufbau.

Automatisierung der Mikroskope

Neben automatisch ablaufenden Vorgängen der Mikrofotografie – Belichtung, Schnellentwickeln, Filmtransport – hat die Halb- und Vollautomatisierung auch auf anderen Gebieten des Mikroskopbaus Eingang gefunden. Gekoppelter Objek-

tiv- und Kondensorwechsel, gekoppelte Objektiv- und Kondensorbewegung, das Immergieren über eine kleine Pumpe und das Übertragen von Meßwerten – Drehwinkel, Verschiebungen – sind Beispiele dafür.
Die Forderung, definierte Flächen an Präparaten systematisch nach bestimmten Ereignissen abzusuchen – z.B. Planktonzählung, Gefüge- und Kernspuruntersuchungen –, führt zu Mikroskopen mit Scanning-Objekttischen. Es liegt nahe, die Bewegungsabläufe in der Objektebene und gelegentlich auch in der Tiefe an einem solchen Mikroskop mechanisch zu steuern. Verbunden mit einer automatischen Auswertung des mikroskopischen Bilds, wird diese Arbeitsweise in immer größerem Umfang angewendet.

4.7. Pflege des Mikroskops

Das Mikroskop ist ein hochwertiges feinmechanisch-optisches, z.T. auch elektrisches Gerät und bedarf einer gewissen Pflege, um seine Leistungsfähigkeit über längere Zeit zu erhalten.
Im erweiterten Sinne beginnt die Pflege bereits bei dem Auspacken der Geräte. Grundsätzlich sollen das Auspacken und der Aufbau nur nach der Gebrauchsanleitung, die jedem Gerät beiliegt, erfolgen.
Die Mikroskope gelangen in einzelne Bausteine zerlegt zum Transport, vielfach in gerätespezifischen Versandbehältern. Der Anwender kann so die übersichtlich verpackten Baueinheiten ohne Mühe zusammensetzen. Außer der Umhüllung packe man größere Geräte am vorgesehenen Standort aus und löse erst dort die eventuell vorhandenen Transportsicherungen.
Ist auch beim ersten Zusammensetzen eine Behandlung der Anschlußgewinde und -flächen nicht erforderlich, empfiehlt es sich, diese von Zeit zu Zeit mit einem säurefreien, nicht harzenden Öl abzureiben.
Geräte, die für den Einsatz in geschlossenen Räumen vorgesehen sind, setze man nicht zu großen Temperaturschwankungen aus und schütze sie vor Feuchtigkeit, chemisch aggressiven Dämpfen und direkter Sonnenbestrahlung. Trotz der geschlossenen Bauart der Mikroskope ist ein Staubschutz beim Aufbewahren dringend zu empfehlen. Häufig liefern die Hersteller für diesen Zweck flexible Schutzhüllen. Beiliegende Staubschutzkappen, -schieber oder ähnliches sollten immer benutzt werden.
Die Führungen und Triebe an modernen Mikroskopen sind so ausgeführt, daß ihre Funktion ohne Wartung über Jahre gesichert ist. Eine Ausnahme bilden die Gleitflächen an Manipulatoren und Gleittischen. Um Funktionsstörungen an solchen Gleitflächen zu vermeiden, sind die Anweisungen in den Gebrauchsanleitungen zu beachten.
Man sorge rechtzeitig für Reparaturen kleiner Schäden aller Art. Für diese Reparaturen und Durchsichten stehen die Werkstätten des Herstellerwerks und seine autorisierten Vertreter zur Verfügung.
Enthält das Mikroskop umfangreichere Elektrikeinheiten, liegen Schaltpläne der Ausrüstung bei. Ein Fachmann kann danach Bauelemente austauschen und Störungen beseitigen. Gehört es auch nicht zur Pflege des Mikroskops, so dient folgender Hinweis der Sicherheit des Benutzers: Der Umgang mit Höchstdrucklampen gebietet größte Vorsicht. Beim Auspacken, Auswechseln und bei allen sonstigen Handhabungen sind Gesichtsschutz und Handschuhe erforderlich. Lampengehäuse sind nur im stromlosen Zustand zu öffnen.

Reinigen der Objektive

Ein regelmäßiges Reinigen der Objektive beschränkt sich auf die Außenfläche der Frontlinse. Immersionsflüssigkeit darf niemals auf der Frontlinse verharzen. Sie wird zunächst mit einem weichen, nicht fasernden Tuch entfernt. Danach säubert man die Frontlinse mit Xylol oder Benzin. Alkohol ist unter keinen Umständen zu verwenden. Andere äußere Verunreinigungen können mit destilliertem Wasser beseitigt werden. Ist gelegentlich der Staub von der Hinterlinse zu entfernen, bedient man sich eines trockenen, weichen Pinsels.
Zeigt das Mikroskop einmal flaue, verschleierte Bilder, kann eine Verunreinigung des Objektivs die Ursache sein. Man prüft die Sauberkeit der Frontlinse im auffallenden Licht, die Hinterlinse hingegen im durchfallenden Licht.
Beim Reinigen der Kondensoren ist in entsprechender Weise wie bei den Objektiven zu verfahren.

Reinigen der Okulare

Verunreinigungen des Okulars sind leicht zu erkennen, da sie sich beim Drehen des Okulars im Tubus mitdrehen. Am besten sind sie sichtbar, wenn kein Präparat im Strahlengang liegt und die Aperturblende extrem eng gestellt ist. Die Außen-

flächen der Linsen reinigt man mit einem Pinsel und einem weichen, nicht fasernden Tuch. Führt dies nicht zum Erfolg, ist es ein Zeichen dafür, daß die Verunreinigungen auf den Innenflächen der Linsen liegen. Das Okular kann dann auseinandergeschraubt werden. Innenliegende, gefaßte Linsensysteme sind nicht zu lösen. An der Okularblende haftende Fremdkörper lassen den Sehfeldrand gezackt erscheinen; man kann sie ebenfalls mit einem Pinsel entfernen.

Reinigen des Stativs

Staub entfernt man am Stativ mit einem Tuch oder auch mit einem Pinsel. In größeren Abständen sollen die Lackflächen mit Putzwatte, die mit Waschbenzin leicht angefeuchtet ist, gereinigt und die blanken Teile mit säurefreiem Öl abgerieben werden. Dabei dürfen Benzin und Öl niemals in die Triebe oder auf die Gleit- bzw. Rollbahnen gelangen.

5. Lichtquellen und Lichtfilter

von Ing. *Joachim Bergner*

5.1. Lichtquellen

5.1.1. Anforderungen an die Lichtquellen für die Mikroskopie

Grundbedingung für die Anwendbarkeit einer Lichtquelle in der Mikroskopie ist, daß ihre Eigenschaften dem speziellen mikroskopischen Untersuchungsverfahren angepaßt sind oder angepaßt werden können.
Zu diesen für die Mikroskopie wichtigen Eigenschaften zählen:

1. Quantität der Strahlung (Strahlungsleistung)
2. Qualität der Strahlung (spektrale Energieverteilung)
3. zeitliche Konstanz von Quantität und Qualität der Strahlung
4. geometrische Form des Strahlungskörpers und die räumliche Konstanz der Strahlung
5. Energieverbrauch
6. Nebenerscheinungen.

In der wissenschaftlichen Mikroskopie wird heute ausschließlich mit elektrisch betriebenen Lichtquellen gearbeitet, wobei diese zumeist ein integrierter Bestandteil des Mikroskops sind (s. Abschn. 4.).
Tageslicht oder Sonne haben sich als unzureichende Lichtquellen für die Mikroskopie erwiesen. Eine universelle Lichtquelle für die Mikroskopie gibt es nicht und wird es auch nicht geben; dafür sind die Anforderungen der einzelnen mikroskopischen Spezialdisziplinen hinsichtlich Qualität und Quantität der Strahlung zu unterschiedlich. Für den rationellen Einsatz der Lichtquellen müssen diese Eigenschaften hinreichend bekannt sein.

5.1.1.1. Quantität der Strahlung

Bei optimaler Anpassung der Lichtquelle an das Mikroskop ist als Maß ihrer Strahlungsleistung bzw. für die durch sie erzeugte Helligkeit des mikroskopischen Bilds die Leuchtdichte der Lichtquelle anzusehen.
Lichtquellen, die in Mikroskopen für vorwiegend subjektiven Gebrauch verwendet werden, sollten eine Leuchtdichte von etwa 800 bis 1000 cd/cm² haben, während z. B. Lichtquellen für großformatige Kameramikroskope Leuchtdichten zwischen 10000 und 20000 cd/cm² aufweisen sollen.

5.1.1.2. Qualität der Strahlung

Die Strahlungsqualität einer Lichtquelle wird durch die spektralen Anteile der Strahlung und deren Intensität ausgedrückt. Grundsätzlich können zwei verschiedene Arten von Lichtquellen unterschieden werden: solche, die Licht aller Wellenlängen aussenden, bei der spektralen Zerlegung der Strahlung also ein kontinuierliches Spektrum erzeugen, und solche, die nur Licht einzelner diskreter Wellenlängen aussenden und damit ein Linienspektrum erzeugen. Zur Charakterisierung eines Kontinuumstrahlers gibt man einen auf den lichttechnischen Bezugskörper (Schwarzer Strahler) bezogenen Temperaturwert an, die sog. Farb- oder Verteilungstemperatur. Dieser Wert bezeichnet die Temperatur des schwarzen Körpers, bei der dieser eine Strahlung gleicher Farbe oder spektraler Energieverteilung aussendet wie der betreffende Strahler. Die Farbtemperatur T_F wird in Kelvin gemessen oder in mired bzw. dekamired angegeben ($T_{F/\mathrm{mired}} = 10^6 : T_{F/K}$). Die in der Mikroskopie angewandten Lichtquellen können ihrer Farbtemperatur nach in zwei Gruppen eingeteilt werden. Eine umfaßt Lichtquellen mit einer Farbtemperatur von etwa 5200 K $\triangleq$ 190 mired, die in ihrer „Lichtfarbe“ damit dem mittleren Tageslicht entsprechen; die anderen Lichtquellen haben eine Farbtemperatur von etwa 3000 K $\triangleq$ 330 mired und entsprechen damit der normalen Kunstlichtbeleuchtung. Strahler mit anderen Farbtemperaturen sollten möglichst vermieden werden, schon um in der Mikrofotografie keine zusätzlichen Anpassungen an das zur Ver-

fügung stehende, auf die genannten Werte sensibilisierte Farbmaterial zu benötigen. Linienstrahler werden durch die Angabe der ausgesandten Hauptwellenlängen genügend charakterisiert.

5.1.1.3. Zeitliche Konstanz der Strahlung

Die spektrale Energieverteilung der Kontinuumstrahler folgt im allgemeinen dem Planckschen Strahlungsgesetz und dem Wienschen Verschiebungsgesetz. Letzteres besagt, daß sich das Maximum der Strahlung (und damit die Farbtemperatur) in Abhängigkeit von der thermischen Belastung verschiebt. Das ist in der Praxis zu beachten, wenn z.B. die Intensität von Glühlampen durch eine Spannungsregelung geändert werden soll. Gleichzeitig damit erfolgt eine Änderung der Farbtemperatur, die z.B. in der Farbmikrofotografie definierte Werte nicht überschreiten darf (s.a. Abschn. 8.2.7.4.).

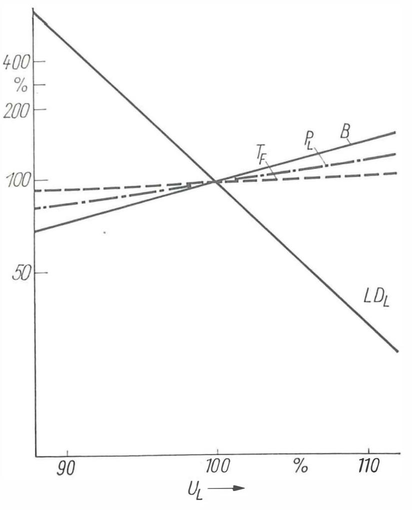


Bild 5.1. Abhängigkeit der Lampenleistungsaufnahme P_L, der Leuchtdichte B, der Farbtemperatur T_F und der Lampenlebensdauer LD_L von der Lampenspannung U_L

Geringe kurzzeitige Änderungen der für den Betrieb der Lichtquellen vorgegebenen elektrischen Werte haben nur einen geringen Einfluß auf die Qualität der Strahlung, können aber einen nicht mehr zulässigen Einfluß auf die Quantität der Strahlung haben. Die Abhängigkeit zwischen Betriebsspannung einer Glühlampe und der Lampenleistungsaufnahme, der Leuchtdichte, der Farbtemperatur und der Lebensdauer ist im Bild 5.1 dargestellt. Um in der Mikrofotografie und vor allem in der Mikrofotometrie einwandfreie Resultate zu erhalten, ist es erforderlich, die Quantität der Strahlung durch Betreiben der Lampe mit stabilisierter Spannung konstant zu halten. Während das vom Benutzer beeinflußbar ist, können Bogeninstabilitäten bei Gasentladungslampen nur bedingt beseitigt, durch richtige Einsatzbedingungen jedoch grundsätzlich vermieden werden. Ist z.B. kurz nach dem Einschalten einer solchen Lampe ein Springen des Bogens zu bemerken, so muß die Lampe sofort ausgeschaltet und nach gegebener Zeit neu gezündet werden. Das Springen des Bogens kann von einem ungünstigen Bogenansatz herrühren. Wird dieser nicht sofort beseitigt, so kann er an der Elektrode einbrennen und damit die Lampe unbrauchbar machen. Ungenügende Kontaktsicherheit beeinflußt die zeitliche Konstanz der Strahlung. Dieser Fehler kann besonders bei Halogenlichtwurflampen mit Zweistiftsockel auftreten. Er wird durch eine Sonderform dieser Lampen (Bild 5.2) beseitigt.

5.1.1.4. Form des Strahlungskörpers und räumliche Konstanz der Strahlung

Die Eignung einer Lichtquelle für die Mikroskopie wird nicht zuletzt durch die geometrische

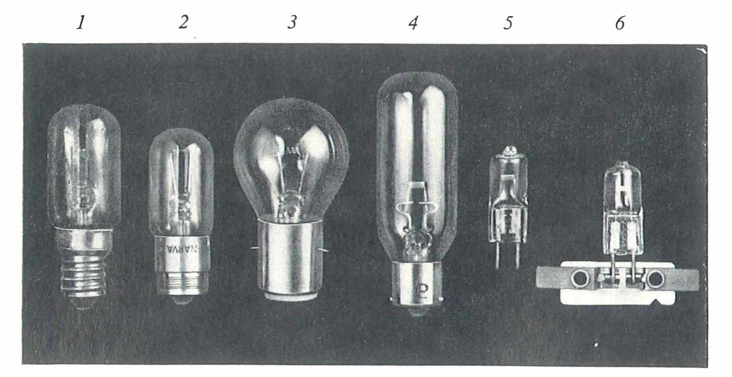


Bild 5.2
Glühlampen für die Mikroskopie
1 Allgebrauchslampe, 220 V/25 W; *2* Niedervoltglühlampe, 6 V/15 W, mit Flachkernwendel; *3* Niedervoltglühlampe, 6 V/30 W, mit Doppelwendel; *4* Niedervoltglühlampe, 12 V/100 W; *5* Halogenglühlampe, 12 V/100 W; *6* Halogenglühlampe, 12 V/100 W auf Trägerplatte

Form des Leuchtkörpers bestimmt. Im Idealfall soll der Leuchtkörper entsprechend der Form der Pupillen des Mikroskops kreisrund sein und den Durchmesser 2 mm möglichst nicht unterschreiten. Neben dem kreisförmigen Leuchtkörper kann auch der quadratische noch mit genügender Effektivität ausgenutzt werden. Die optimale Ausnutzung der Lampenleistung wird immer geringer, je weiter sich die Leuchtkörperform vom Quadrat entfernt.
Mit der Forderung nach räumlicher Konstanz der Strahlung soll ausgedrückt werden, daß von Flächenelement zu Flächenelement der Gesamtstrahlungsfläche annähernd gleiche Leuchtdichte herrschen soll. Das wird auf dem Glühlampensektor am besten von den sog. Flachkernwendellampen erreicht. Gasentladungslampen ohne ausgesprochenen Katodenbrennfleck sind in dieser Beziehung merklich günstiger als solche mit Brennfleck. Eine ungenügende räumliche Konstanz der Strahlung kann sich bei empfindlichen Objekten im mikroskopischen Bild in Azimuteffekten und damit in einer Vortäuschung nicht vorhandener Strukturelemente ebenso wie in ungleicher Dingfeldausleuchtung bemerkbar machen.

5.1.1.5. Energieverbrauch und Nebenerscheinungen

Der Verbrauch an elektrischer Energie spielt bei der Auswahl der Lichtquelle für die Mikroskopie so lange eine untergeordnete Rolle, wie diese Lichtquelle noch mit dem normalen Lichtnetz betrieben werden kann, d.h., die primäre Stromaufnahme unter 10 A bleibt. Lichtquellen höherer elektrischer Leistung erfordern entweder eine eigene Installation oder ein kompliziertes und damit teures Vorschaltgerät, was nicht immer durch eine entsprechende Erhöhung der Strahlungsleistung gerechtfertigt ist. Wirtschaftliche Erwägungen müssen mitunter im Interesse einer hohen Lichtleistung oder einer angemessenen Sicherheit für Gerät und Benutzer zurückgestellt werden. So ist bei den meisten Entladungslampen eine maximale Lebensdauer angegeben, mit deren Überschreitung die Gefahr der Explosion des Brenners wächst. Solche Lampen sind nach Erreichen der vorgeschriebenen Lebensdauer auszuwechseln.
Unangenehme Nebenerscheinungen bei Hochleistungs-Mikroskopierleuchten sind oft die Entwicklung von Wärme und von Gasen. Kohlebogenlampen z.B. ermöglichen die Bildung nitroser Gase. Es ist daher bei deren Anwendung für eine Absauganlage zu sorgen. Weniger schädlich als unangenehm ist die Ozonbildung durch eine Reihe von Gasentladungslampen. Das ist in neuerer Zeit z.T. vom Lampenhersteller unterbunden worden. Solche Lampen sind zu bevorzugen, wenn nicht gerade auf den beseitigten UV-Spektralbereich unterhalb $\lambda = 250$ nm Wert gelegt wird.

5.1.2. Glühlampen

Den größten Anteil an der Gesamtsumme der mikroskopischen Lichtquellen bilden Niedervoltglühlampen, die mit 6 bis 24 V Gleich- oder Wechselspannung betrieben werden. Niedervoltglühlampen erreichen Leuchtdichten von etwa 1000 bis 4000 cd/cm^2 und sind damit für den größten Teil der mikroskopischen und mikrofotografischen Verfahren geeignet.
Allgebrauchsglühlampen geringerer Leistung haben aufgrund des weit auseinandergezogenen Glühfadens (Bild 5.2) eine schlechte räumliche Konstanz der Strahlung. Sie werden in der Mikroskopie zu Kurszwecken als sehr preisgünstige Lichtquellen verwendet; dabei wird durch eine stark streuende Scheibe (Mattglas, Opalscheibe) versucht, die räumliche Konstanz der Strahlung so weit zu verbessern, daß mit dem Mikroskop-Kondensor eine für die subjektive Mikroskopie ausreichend gleichmäßige Dingfeldausleuchtung möglich ist.
Die Nutzlebensdauer der Niedervoltglühlampen liegt bei 50 bis 100 h (Absinken der Lichtstärke auf 75% des Anfangswerts). Die absolute Lebensdauer bis zur mechanischen Zerstörung der Lampe kann wesentlich größer sein. Allerdings ist nach dem Erreichen der Nutzlebensdauer mit einer zunehmenden Schwärzung des Lampenkolbens durch das vom Glühfaden verdampfende Wolfram zu rechnen, die die Lichtleistung erheblich herabsetzt. Eine entscheidende Verbesserung bieten in dieser Beziehung die Halogenglühlampen; das sind Niedervoltglühlampen, in deren evakuierten Kolben zusätzlich zur Edelgasfüllung genau dosierte Mengen von Jod oder Brom zugesetzt wurden. Gleichzeitig konnten bei den Halogenglühlampen die Nutzlebensdauer gegenüber gleich starken normalen Glühlampen auf das Doppelte verbessert und die mechanische Größe um ein mehrfaches verkleinert werden. Halogenglühlampen (Bild 5.2) sind daher die z.Z. wirtschaftlichsten Lichtquellen dieser Gattung, erfordern aber für lichtkonstanten Betrieb be-

sondere Maßnahmen an der Lampe. Bild 5.2 zeigt eine zentriert mit einer Trägerplatte verbundene Halogenlampe, die dadurch hohe Kontaktsicherheit und Lichtstromkonstanz erreicht.
Die Farbtemperatur der Niedervoltglühlampen liegt im allgemeinen zwischen 2800 und 3200 K und damit in dem Bereich, auf den Kunstlichtfarbfilme sensibilisiert sind.

5.1.3. Kohlebogenlampen

Eine der ältesten künstlichen Lichtquellen für die Mikroskopie ist die Kohlebogenlampe, die die meisten störenden Nebenerscheinungen, wie Wärmeentwicklung, Bildung nitroser Gase und umständliche Bedienung zeigt, sich aber gleichzeitig auch durch große Universalität und eine gute Homogenität des Leuchtfelds auszeichnet. Bogenlampen mit Reinkohleelektroden können in allen Spektralbereichen zwischen etwa 300 und 1000 nm und auch als Fluoreszenzstrahlungsquellen angewendet werden. Als Leuchtkörper wird einer der sich an den Elektroden ausbildenden Krater verwendet, der aufgrund seines kreisförmigen Querschnitts beste Ausleuchtungsmöglichkeiten für Eintrittspupille und Dingfeld des Mikroskops bietet. Die Elektroden der Lampe müssen so angeordnet sein, daß der nicht zur Beleuchtung verwendete Krater außerhalb des vom Kollektor aufgenommenen Strahlenkegels liegt.

5.1.4. Entladungslampen

5.1.4.1. Xenon-Höchstdrucklampen

Xenon-Höchstdrucklampen (Bild 5.3) sind die gegenwärtig effektivsten Hochleistungslichtquellen für die Mikroskopie und Mikrofotografie. Die ungünstigen Abmessungen des Leuchtfelds (Kurzbogen mit einem Verhältnis $b:h \approx 1:2$) werden von den ausgezeichneten Strahlungseigenschaften weitgehend kompensiert. Für Lichtwurfzwecke werden Xenon-Höchstdrucklampen mit Leistungsaufnahmen zwischen 75 und 450 W hergestellt. Diese Lampen erreichen Leuchtdichten zwischen 10000 und etwa 40000 cd/cm^2; sie eignen sich daher vorzüglich für die Grundausstattung großformatiger Kameramikroskope. Für die meisten Anwendungsgebiete reichen Lampen mittlerer Leistungsaufnahme (BGW-XBO 101, OSRAM-XBO 150 W).
Die unter hohem Druck (etwa $2 \cdot 10^6$ N/m^2) erfolgende Gasentladung des Xenon liefert im sichtbaren Spektralbereich eine kontinuierliche Strahlung mit einer Farbtemperatur von etwa 5600 K, die der des mittleren Tageslichts entspricht. Dazu kommen einige sehr starke Linien im nahen Infrarot (Bild 5.4) bei etwa 820, 900 und 980 nm Wellenlänge. Da die Xenon-Höchstdrucklampen auch im nahen UV über eine vorwiegend kontinuierliche Strahlung verfügen (die allerdings wesentlich weniger intensiv als die der Quecksilberlampen ist), können sie auch in diesem Gebiet Verwendung finden. Weitere Vorteile der

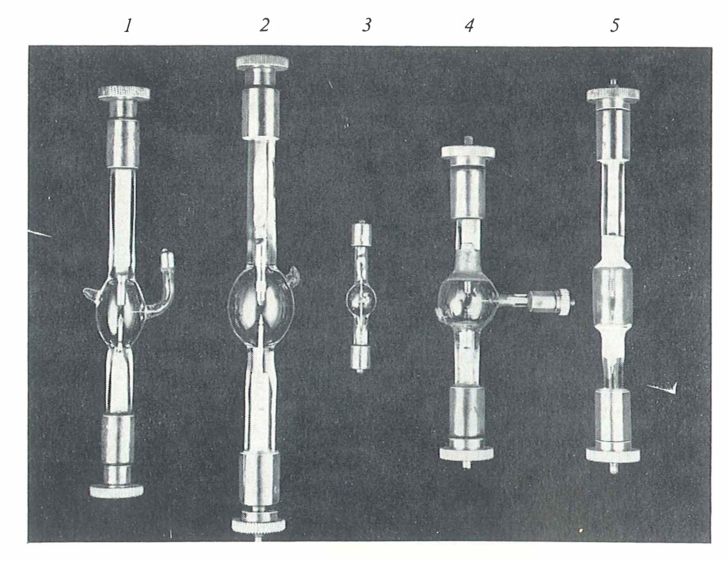


Bild 5.3. Entladungslampen für die Mikroskopie

1 Xenon-Höchstdrucklampe XBO 101; *2* Xenon-Höchstdrucklampe XBO 150; *3* Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 50; *4* Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 200; *5* Metall-Halogenidlampe HBI 250

Xenon-Höchstdrucklampen sind die Unabhängigkeit der Farbtemperatur vom Lampenstrom und die guten Zündeigenschaften. Die Lampe erreicht bereits kurz nach dem Zünden ihre endgültigen elektrischen und lichttechnischen Sollwerte und kann nach dem Abschalten unmittelbar wieder gezündet werden. Im Interesse einer erhöhten Lebensdauer soll jedoch nicht zu oft gezündet werden. Erfahrungsgemäß entspricht jede Zündung einem Verlust von 1 h Lebensdauer.

Xenon-Höchstdrucklampen werden sowohl für Gleich- als auch für Wechselstrombetrieb hergestellt. Der Gleichstrombetrieb ist hinsichtlich Zündverhaltens, Bogenstabilität und Lebensdauer vorteilhafter als der Wechselstrombetrieb. Es muß jedoch beachtet werden, daß die Strompulsation des gleichgerichteten Wechselstroms 3% nicht überschreiten darf, will man die bei Gleichspannungsbetrieb erreichbaren günstigeren Eigenschaften nicht von vornherein in Frage stellen. Der feste Sitz der Spannungszuführung an der Lampe ist in regelmäßigen Abständen zu kontrollieren, da die Übergangswiderstände an den Zuführungen so niedrig wie möglich gehalten werden müssen. Es ist weiterhin für eine ausreichende Belüftung zu sorgen, so daß die Temperatur an der oberen Sockelhülse 230°C nicht überschreitet. Wird der Xenonbogen zum Erhöhen der mittleren Leuchtdichte durch einen sphärischen Spiegel invers in sich abgebildet, so ist unbedingt darauf zu achten, daß dieses Spiegelbild nicht auf die Elektroden abgebildet wird, weil diese sonst zu stark aufgeheizt werden, was zu einer Lampenexplosion führen kann. Die mittlere Leuchtdichte kann durch den Hilfsspiegel um 70 bis 80% gesteigert werden, ohne daß die Lebensdauer entscheidend beeinflußt wird.

Da die Xenonlampe bereits im kalten Zustand unter einem Innendruck von 8 bis $10 \cdot 10^5$ N/m² steht, ist sie sorgfältig zu handhaben.

5.1.4.2. Xenon-Blitzröhren

Xenon-Blitzröhren für Elektronenblitze oder Mikroblitze haben die gleichen günstigen Strahlungseigenschaften wie die Xenon-Höchstdrucklampen; handelsübliche Blitzröhren haben gleiche Farbtemperatur, aber geringere Leuchtdichte. Sollte das bei der durchzuführenden mikrofotografischen Arbeit von großem Nachteil sein, kann auch eine Xenon-Höchstdrucklampe mit einem geeigneten Vorschaltgerät als Blitzlampe verwendet werden, wobei sie ohne weiteres bis zum Faktor 3 überlastet werden kann. In beiden Fällen enthält das Spektrum des Blitzlichts weniger Infrarot als das der XBO-Lampen, da hier die glühenden Wolframelektroden fehlen. Blitzröhren können also vorteilhaft bei der Untersuchung solcher physiologischer Vorgänge eingesetzt werden, die infrarotempfindlich sind.

5.1.4.3. Quecksilber-Höchstdrucklampen

Quecksilber-Höchstdrucklampen liefern ein gehobenes Kontinuum, dem ein Linienspektrum überlagert ist, dessen größter Teil im kurzwelligen Spektralbereich liegt (Bild 5.4). Die Emission bei $\lambda = 254$ und 266 nm wird in der UV-Mikroskopie, die Emission bei $\lambda = 365$ und 405 nm in der Fluoreszenzmikroskopie ausgenutzt. Im sichtbaren Spektralbereich spielen Quecksilber-Höchstdrucklampen nur dann eine Rolle, wenn eine monochromatische Lichtquelle für $\lambda = 546$ nm erforderlich ist. Wegen des Linienspektrums ist der Einsatz von Quecksilber-Höchstdrucklampen in der Mikroskopie farbiger oder gefärbter Objekte nicht zu empfehlen.

Quecksilber-Höchstdrucklampen werden mit Leistungsaufnahmen zwischen 50 und 500 W hergestellt; die Leuchtdichte variiert zwischen 20000 und 100000 cd/cm². Der Entladungsbogen hat im wesentlichen die gleiche Form wie der Xenonbogen. Im Gegensatz zur Xenonlampe erreicht

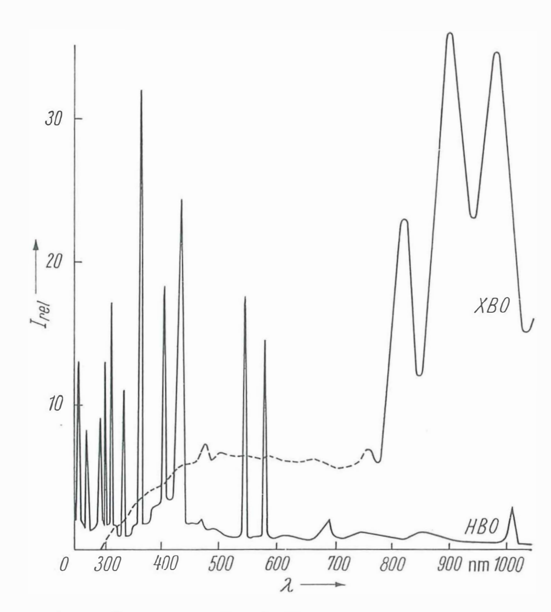


Bild 5.4. Relative spektrale Energieverteilung einer Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO und einer Xenon-Höchstdrucklampe XBO

die Quecksilberlampe erst einige Minuten nach dem Zünden ihre volle Leistung. Quecksilberlampen mit Nebenstromzündung können im allgemeinen auch erst nach dem Erkalten neu gezündet werden. Der Betriebsdruck steigt im warmen Zustand bis auf $75 \cdot 10^5$ N/ m²; im Kaltzustand weist die Quecksilberlampe keinen Überdruck auf (Grundgasfüllung mit etwa $5 \cdot 10^3$ N/m²), so daß das Hantieren mit ihr weniger gefährlich als mit der XBO ist. Für die Betriebsbedingungen gelten im wesentlichen die gleichen Vorschriften, wie sie bei der Beschreibung der Xenonlampe erwähnt wurden.

5.1.4.4. Quecksilber-Halogenid-Lampen

In der jüngsten Vergangenheit wurden erfolgreiche Versuche zur Verbesserung der Strahlungsqualität von Quecksilber-Höchstdrucklampen bekannt. Das aufgrund des hohen Drucks vorhandene, allerdings wenig intensive Kontinuum wurde durch Zusätze bestimmter Metall-Halogenide relativ zur Linienstrahlung so weit angehoben, daß man der so entstandenen Lichtquelle bereits eine Farbtemperatur ($T_F = 3700$ K) zuordnen kann. Mit diesen Metall-Halogenid-Lampen (Typ HBI oder CSI) stehen erstmals Kunstlichtquellen hoher Leuchtdichte zur Verfügung.

5.1.4.5. Quecksilber-Niederdrucklampen (Leuchtstofflampen)

Die mit Hochspannung bis zu 1000 V betriebenen Quecksilber-Niederdrucklampen mit Leuchtstoffschicht werden meist röhrenförmig ausgebildet (Leuchtstoffröhren) und haben gegenüber den HBO-Lampen ein verbessertes Spektrum, da bei ihnen ein Teil der ursprünglichen Strahlung durch Fluoreszenz umgewandelt wird. Quecksilber-Niederdrucklampen werden meist als Lichtquellen für die Makro- und Lupenfotografie verwendet, wo sie aufgrund ihrer großflächigen Anordnung zu einer wesentlich verbesserten Ausleuchtung der Dingfelder führen können. Farbaufnahmen mit solchen Lampen werden nicht immer zur Zufriedenheit ausfallen, da das Quecksilber-Linienspektrum immer noch überwiegt. Von der Art der Fluoreszenzstoffe ist es abhängig, welcher Farbfilmtyp verwendet werden muß; hier sind jeweils Versuche unerläßlich.

5.2. Lichtfilter

5.2.1. Kennzeichnung von Lichtfiltern

Obwohl durch passende Wahl der Lichtquelle in vielen Fällen eine optimale Anpassung des spektralen Strahlungsflusses an die Erfordernisse des mikroskopischen Untersuchungsverfahrens möglich ist, muß in ebenso vielen Fällen eine Korrektur der Lampenausstrahlung sowohl in Qualität als auch in Quantität vorgenommen werden. Zu diesem Zweck werden Lichtfilter verwendet, optische Bauelemente mit typischen spektralen Transmissionseigenschaften. Bei der Anwendung der Lichtfilter ist die Kenntnis der spektralen Transmissionseigenschaften (Transmissions- bzw. Absorptionskurve) sowie des Gesamtintensitätsverlustes bei Verwendung des Filters (Filterfaktor) notwendig. Diese Werte können entsprechenden Katalogen entnommen werden.

Lichtfilter werden nach ihrer Filterfunktion unterschieden, wobei nach dieser Einteilung ein Lichtfilter durchaus in mehrere Gruppen eingeordnet werden kann. Durch Kombination von Filtern unterschiedlicher Transmission kann ein Filter mit neuen Eigenschaften gewonnen werden.

Unabhängig von ihrer Ausführungsform sollen Lichtfilter möglichst im Beleuchtungsstrahlengang angeordnet werden, da in diesem Raum keine so hohe Anforderung an die optische Qualität des Filters gestellt zu werden braucht.

5.2.2. Lichtfiltergruppen

5.2.2.1. Kontrastfilter

Kontrastfilter werden in der Mikroskopie und besonders in der Mikrofotografie dazu angewendet, den relativen Intensitätsunterschied zwischen zwei verschieden gefärbten (oder farbigen) Komponenten des Objekts zu vergrößern oder zu vermindern. Grundsätzlich kann jedes farbige Lichtfilter als Kontrastfilter verwendet werden. Für die Auswahl gilt die Regel, daß Objekte, deren Färbung mit dem vom Filter vorzugsweise durchgelassenen Spektralbereich zusammenfällt, hell, komplementär gefärbte dagegen dunkel wiedergegeben werden.

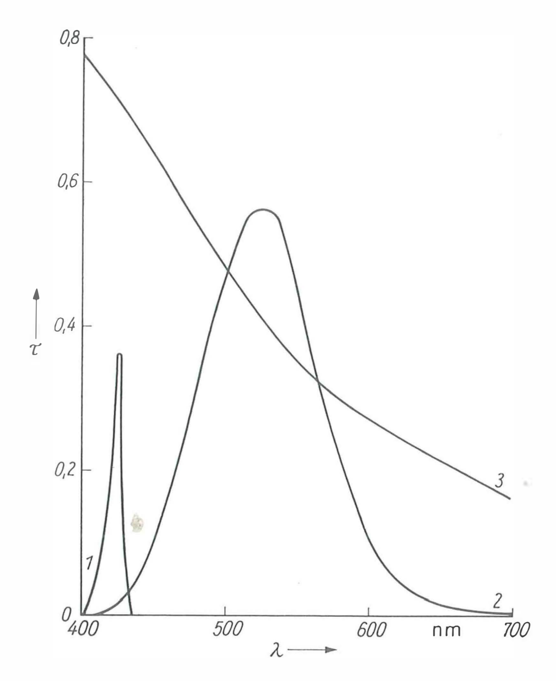


Bild 5.5. Transmissionskurven
eines Metallinterferenzfilters *1*, eines absorbierenden Selektionsfilters *2* und eines Konversionsfilters *3*

5.2.2.2. Kompensationsfilter

Die in der Mikroskopie verwendeten Kompensationsfilter dienen zur Anpassung der spektralen oder absoluten Energie der Lichtquelle an das spezifische Untersuchungsverfahren. So erfordert der Einsatz von Niedervoltglühlampen in der Polarisationsmikroskopie wegen der dort konventionell festgelegten Bezugs-Farbtemperatur für die Polarisationsfarben die Anwendung eines sog. Tageslichtfilters. Kompensationsfilter, mit denen die Farbtemperatur der Lichtquelle nach höheren oder tieferen Werten verschoben wird, werden als Konversionsfilter bezeichnet und mit dem Dekamired-Wert gekennzeichnet, um den sie die Farbtemperatur nach Blau (B) oder Rot (R) verschieben. Das oben genannte Tageslichtfilter wäre danach ein Konversionsfilter B 14, da es die Farbtemperatur der Glühlampe (33 dekamired) der des Tageslichts (19 dekamired) angleicht. Zu den Kompensationsfiltern zählen definitionsgemäß auch bestimmte Gelbgrünfilter, die in der Mikrofotografie mit panchromatischem Negativmaterial eine tonwertrichtige Wiedergabe bewirken (z.B. VE 55-82 vom VEB Schott), sowie die zur Intensitätsminderung verwendeten Dämpfungs- oder Neutralfilter. Die Anwendung neutral absorbierender Dämpfungsfilter zur Helligkeitsregelung des mikroskopischen Bilds ist immer der Regelung durch Spannungsänderung an der Glühlampe vorzuziehen, weil hierbei keine Änderung der Farbtemperatur auftritt.

5.2.2.3. Korrektionsfilter

Korrektionsfilter dienen zur Behebung noch vorhandener chromatischer Abbildungsfehler und beseitigen vor allem die am Bildfeldrand auftretenden störenden Farbsäume an den Objektstrukturen. Voraussetzung hierfür ist eine genügend kleine Bandbreite des Filters. Bei Verwendung apochromatischer Optik können notwendige Korrektionsfilter z.B. zum Beseitigen restlicher chromatischer Vergrößerungsdifferenz beliebig liegende Durchlaßbanden innerhalb des sichtbaren Spektralbereichs aufweisen. Bei achromatischer Optik werden dagegen wegen deren sphärischer Korrektion ausschließlich grüne Korrektionsfilter (z.B. VE 53-62) verwendet.

Die genannten Korrektionsfilter sind im engeren Sinne bereits eine Untergruppe der Selektionsfilter, die durch die Aussonderung eines genügend engen Spektralbereichs aus dem kontinuierlichen Spektrum einer Lichtquelle definiert sind. Ein Maß für die Güte der Selektion ist die Halbwertsbreite, d.i. die Differenz der Wellenlängen, bei denen der Transmissionsgrad des Filters auf die Hälfte des Maximalwerts abgesunken ist. Lichtfilter aus optischem Filterglas oder eingefärbter Gelatine erreichen kaum Halbwertsbreiten unter 50 nm. Für höhere Anforderungen sind Selektionsfilter auf der Basis von Interferenzfiltern zu wählen, mit denen Halbwertsbreiten bis zu etwa 5 nm erreicht werden können (Bild 5.5).

5.2.3. Filterarten

5.2.3.1. Absorptionsfilter

Die Wirkung der Absorptionsfilter beruht auf der selektiven Absorption eines mehr oder weniger großen Anteils des einfallenden Lichtstroms, die durch einen wellenlängenabhängigen Absorptionskoeffizienten charakterisiert ist. Je nach dessen Größe wird vom Filter die spektrale Zusammensetzung des einfallenden Lichts verändert. Absorbierende Filter können auf verschiedenen Grundlagen hergestellt werden. Die größten Variationsmöglichkeiten bieten eingefärbte Folien,

bei denen durch Farbstoff- und Konzentrationsänderung praktisch jede gewünschte Absorption erzielt werden kann. Diese Folien sind mechanisch und thermisch nicht so beständig wie die in der Masse durch Zusatz bestimmter, meist anorganischer Stoffe eingefärbten Filter aus optischem Filterglas. Für den Selbstansatz bestimmt sind Flüssigkeitsfilter, die im Bedarfsfall schnell ein fehlendes Filter ersetzen können. Es werden gefärbte Salze in verschieden starken wäßrigen Lösungen verwendet, wie Nickelsulfat, Kupfersulfat, Kaliumdichromat, Kaliumchromat u. a.

5.2.3.2. Interferenzfilter

Interferenzfilter mit ihren geringen Halbwertsbreiten werden besonders in der Interferenzmikroskopie und Mikrofotometrie angewendet. Die meist verwendete Art sind die Metallinterferenzfilter, die aus einer optisch wirksamen Schicht definierter Dicke, die beiderseitig mit teildurchlässigen Metallschichten belegt ist, bestehen. Die dielektrische Schicht kann planparallel sein. Dann wird ein spezifischer, von der Schichtdicke abhängiger Wellenlängenbereich ausgesondert. Mit einer keilförmigen Schicht werden Verlaufinterferenzfilter erzeugt, die auf einer vom Keilwinkel abhängigen Filterlänge Teilbereiche des gesamten sichtbaren Spektrums in kontinuierlicher Aufeinanderfolge durchlassen und damit als einfache Monochromatoren verwendet werden können. Metallinterferenzfilter haben bei einem Maximaltransmissionsgrad von etwa 40% meist Halbwertsbreiten um 10 nm. Doppelmetallinterferenzfilter erreichen Halbwertsbreiten bis zu 5 nm allerdings auf Kosten des bis auf 10% sinkenden Transmissionsgrads. Auch bei planparallelen Metallinterferenzfiltern kann die durchgelassene Wellenlänge in gewissen Grenzen (etwa 10 bis 20 nm bei nahezu gleichbleibender Halbwertsbreite) nach der kurzwelligen Seite hin variiert werden, indem das Filter im Parallelstrahlengang gegen die Lichteinfallsrichtung gedreht wird, das Lichtbündel das Filter also schräg durchsetzt (Bild 5.6). Der gleiche Effekt würde bei Anordnung des Metallinterferenzfilters im stark konvergenten oder divergenten Strahlengang zu einer Vergrößerung der im telezentrischen Strahlengang erreichbaren Halbwertsbreite führen. Letztgenannter ist daher für die Anordnung von Metallinterferenzfiltern vorzuziehen.

Zu den Interferenzfiltern können auch die gezählt werden, die die Filterwirkung mit doppelbrechenden, meist drehenden Substanzen zwischen einem Paar Polarisationsfilter erzielen. In ihren optischen Parametern und in ihrer Handlichkeit sind sie den Metallinterferenzfiltern unterlegen.

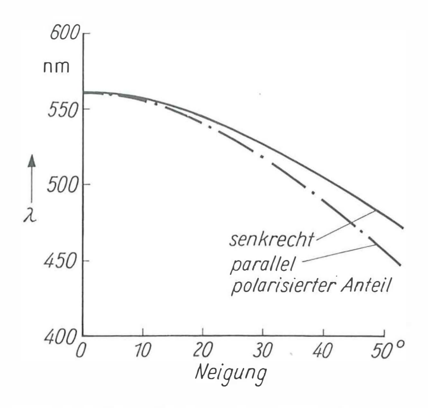


Bild 5.6. Verschiebung der Wellenlänge maximaler Transmission bei Neigung eines Metallinterferenzfilters im Parallelstrahlengang (nach Zeiss-Druckschrift 32–846)

5.3. Übersicht über die Haupteigenschaften der gebräuchlichen Lichtquellen für die Mikroskopie

Bezeichnung	Hersteller	Lampen-spannung V	Lampen-strom A	Leistungs-aufnahme W	Leucht-körper $b \times h$	Leucht-dichte cd/cm²	Farb-tempe-ratur K	Lebens-dauer h
Lichtwurflampe 6/15 T–P5–6 V 15W–TGL 10619	NARVA	6≅	2,5	15	1,8×1,8	900	2950	100
Lichtwurflampe 12/100 S1–12 V 100 W–TGL 11381	NARVA	12≅	8,3	100	4,3 × 2,6	2800	3350	25
Halogenlampe 12/100 S4–12 V 100 W–TGL 11381	NARVA	12≅	8,3	100	4,2 × 2,3	3800	3400	50
Halogenlampe 12/50 T–S 12 V 50 W–TGL 10619	NARVA	12≅	4,5	54	2,4 × 2,4	2600	3300	50
Halogenlampe 24/250 S4–24 V 250 W–TGL 11381	NARVA	24≅	11,1	250	7,0 × 3,6	4100	3490	50
Kohlebogenlampe	–	50=	6	300	2,5 ∅	16500	3850	–
		50~	10	500	2,5 ∅	10500	3450	
Xenon-Höchstdrucklampe XBO 75 W	OSRAM	14=[1]	5,4	75	0,25 × 0,5	40000	5200	400
Xenon-Höchstdrucklampe XBO 101	BGW	16=[1]	6,2[1]	100	0,6×1,3	10000	5150	500
Xenon-Höchstdrucklampe XBO 100	BGW	14~[1]	7,1[1]	100	0,6×1,3	10000	5150	120
Xenon-Höchstdrucklampe XBO 150 W/1	OSRAM	20=[1]	7,5	150	0,5×2,2 1,1×2,2	10000 6200	5600	1200
Xenon-Höchstdrucklampe XBO 450 W	OSRAM	18=[1]	25[1]	450	0,9×2,8	35000	5200	2000
Hg-Höchstdrucklampe HBO 50	BGW	40≅[1]	1,3[1]	50	0,6×1,2	17500	–	120
Hg-Höchstdrucklampe HBO 100	BGW	18=[1]	5,2[1]	100	0,3×0,5	85000	–	150
Hg-Höchstdrucklampe HBO 200	BGW	65≅[1]	3,0[1]	200	1,2×2,4	20000	–	200
Hg-Höchstdrucklampe HBO 202	BGW	60~[1]	3,4[1]	200	1,2×2,4	22000	–	300
Metallhalogenidlampe HBI 250	OSRAM	52~[1]	4,8	250	0,8×2,5	23000	3700	200

[1]) Mittelwert

6. Mikroskopierverfahren und ihre Anwendung

6.1. Durchlichtmikroskopie [52] [53] [84]

6.1.1. Hellfeld

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*
und Dr. rer. nat. *Ludwig Otto*

6.1.1.1. Allgemeines

Im Mikroskop werden meist nicht selbstleuchtende Objekte untersucht, d.h. solche, die erst nach Beleuchtung sichtbar werden. Je nach Art der Strahlenführung unterscheiden wir zunächst zwischen Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung. Hellfeldbeleuchtung liegt vor, wenn (Bild 6.1) die beleuchtenden Strahlen innerhalb des schraffierten Kegels in die Objektebene *1* einfallen und, wenn kein ablenkendes Objekt vorhanden ist, auch in das Objektiv *2* gelangen. Das entspricht (s.a. Abschn. 3.3.) dem Fall, wo das gesamte durch das Objekt gegangene direkte Licht unverändert zur Bildentstehung beiträgt.

Fallen die beleuchtenden Strahlen außerhalb des schraffierten Kegels in die Objektebene ein, dann liegt die normale Dunkelfeldbeleuchtung vor, und zwar im Durchlicht, wenn die beleuchtenden Strahlen von unten, und im Auflicht, wenn sie von oben in die Objektebene einfallen. Es trägt dann nur gebeugtes Licht zur Bildentstehung bei, so daß die Objektstrukturen hell auf dunklem Grund erscheinen.

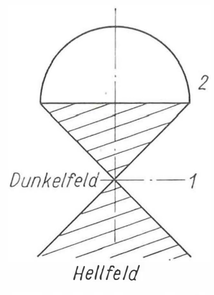


Bild 6.1. Schematische Darstellung der Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung
1 Objektebene; *2* Objektiv

6.1.1.2. Köhlersches Beleuchtungsverfahren

Die zweckmäßige Beleuchtung des Präparats spielt in der gesamten Mikroskopie eine entscheidende Rolle; denn es hängt in starkem Maße von ihr ab, ob das Leistungsvermögen des optischen Systems voll ausgenutzt werden kann.

Für die Hellfeldmikroskopie wird heute überwiegend die von *A. Köhler* [53] angegebene Beleuchtungsanordnung benutzt, die unter der Bezeichnung „Köhlersches Beleuchtungsverfahren" bekannt ist. Diese Beleuchtungsanordnung verfolgt den Zweck, bei optimaler Ausnutzung der Lichtleistung der Lichtquelle eine gleichmäßige Ausleuchtung des Dingfelds und der Eintrittspupille des Mikroskops zu erreichen, um sowohl die Größe des ausgeleuchteten Felds als auch die Größe der Beleuchtungsapertur unabhängig voneinander variieren und damit an die Objektart und die günstigsten Beobachtungsbedingungen anpassen zu können. Sie wird anhand des im Bild 6.2 gezeigten Aufbaus beschrieben.

Die wesentlichsten Bestandteile sind neben Objektiv *7* und Okular *10* eine möglichst flächenhaft strahlende Lichtquelle *1*, der Kollektor *2*, die Leuchtfeldblende *3*, die Aperturblende *4* und der Kondensor *5*.

Der Kollektor bildet zunächst die Lichtquelle vergrößert in die Aperturblende ab (Beleuchtungsstrahlengang ausgezogen gezeichnet). Der maximal wirksame Radius dieses Bilds ergibt sich aus dem Produkt von Kondensorapertur und Kondensorbrennweite. Das Lichtquellenbild muß mindestens die gleiche Größe haben wie die Eintrittspupille des Mikroskops, wenn die Kondensorapertur voll ausgenutzt werden soll. Die Aperturblende wird von Kondensor und Objektiv in die Austrittspupille *8* des Objektivs *7*, die bei den meisten Mikroskopen etwa mit der Objektivbrennebene zusammenfällt, und mit dem Okular

10 in die Austrittspupille *11* des Mikroskops abgebildet.
Entsprechend dem gestrichelt gezeichneten Abbildungsstrahlengang wird die Leuchtfeldblende zuerst durch den Kondensor in die Objektebene *6*, durch das Objektiv *7* in die Zwischenbildebene *9* und durch das Okular *10* ins Unendliche abgebildet. Die Größe des zu gleicher Zeit übersehbaren Präparatanteils (des Dingfelds) wird durch die im Okular am Ort des Zwischenbilds gelegene Feldblende festgelegt. Lichtquelle, Kollektor, Leuchtfeldblende und Kondensor müssen so dimensioniert sein, daß das Dingfeld gleichmäßig ausgeleuchtet wird.
Im Idealfall erfüllt jedes von irgendeinem Punkt der Lichtquelle ausgehende Beleuchtungsbündel die ganze Leuchtfeldblende und hat seine engste Einschnürung in der Aperturblende. Für alle Bündel des Abbildungsstrahlengangs ist es gerade umgekehrt. Sie erfüllen die ganze Aperturblende und haben ihre engste Einschnürung in der Leuchtfeldblende. Deshalb ist es einerseits möglich, durch Ändern der Aperturblende die Beleuchtungsapertur zu variieren, ohne dabei die Größe des weiterhin gleichmäßig ausgeleuchteten Felds zu ändern, und andererseits durch Ändern der Leuchtfeldblende die Größe des ausgeleuchteten Felds zu variieren, ohne dabei die Beleuchtungsapertur zu ändern. Beides ist aus folgenden Gründen für die mikroskopische Praxis, bei visueller Beobachtung und für die Mikrofotografie, von großer Wichtigkeit:
Nach den Erörterungen im Abschn. 3.2.4., besonders der Gl. (3.6c), hängt das Auflösungsvermögen des Mikroskops sowohl von der Apertur des Objektivs als auch der Beleuchtungsapertur ab. Man erhält danach die größte Auflösung, wenn beide gleich sind. Es sind aber nicht in jedem Fall höchste Beleuchtungsaperturen anzustreben, sondern man wird im allgemeinen die Beleuchtungsapertur geringer als die Objektivapertur wählen, weil mit zunehmender Beleuchtungsapertur zwar das theoretisch erreichbare Auflösungsvermögen zunimmt (s.a. Abschnitt 3.2.4.), der Kontrast aber nachläßt, so daß in den meisten Fällen der mikroskopischen Praxis die theoretische Grenze des Auflösungsvermögens wegen mangelnden Kontrastes nicht ganz erreicht wird. Man muß deshalb einen Kompromiß zwischen erreichbarer Auflösung und Kontrast schließen. Er besteht darin, daß die Beleuchtungsapertur auf ein von den Objekteigenschaften abhängiges Maß abgeblendet wird.
Wird andererseits die Lichtquelle (z.B. die Wendel einer Glühlampe) nicht mit ausreichender Größe in die Aperturblende abgebildet, kann man sich mit einer streuenden Mattscheibe helfen. Sie wird zwischen Kollektor und Leuchtfeldblende eingeschoben. Hierdurch wird das Wendelbild zerstört und die Aperturblende gleichmäßig ausgeleuchtet. Es tritt allerdings ein geringer Lichtverlust ein. Da sich die Mattscheibe, in Lichtrichtung gesehen, noch vor der Leuchtfeldblende befindet, können Apertur- und Leuchtfeldblende weiterhin abgebildet werden und voll ihre Aufgabe erfüllen.
Der Bildkontrast hängt außerdem von der Größe des ausgeleuchteten Felds ab. Dieses soll deshalb nicht wesentlich größer als das Dingfeld sein. Denn alle außerhalb desselben liegenden und unnötig beleuchteten Präparatbereiche würden Anlaß zu parasitärem Streulicht und damit u. U. zu einer Verschleierung des Bilds geben. Da das Dingfeld dem Abbildungsmaßstab der Objektive umgekehrt proportional ist, muß bei jedem Objektivwechsel die Größe der Leuchtfeldblende geändert werden. In Fällen, in denen es genügt, nur einen kleinen Teil des Dingfelds zu beobachten, besonders wenn es sich um temperaturempfindliche Präparate handelt, wird man die Leuchtfeldblende auch noch weiter schließen, als es dem Dingfeld entspricht. So läßt sich der Kontrast weiter verbessern und die Erwärmung des Präparats auf ein Minimum senken. Strahlungsempfindliche gefärbte Präparate werden so vor dem Ausbleichen geschützt. Da hierdurch die

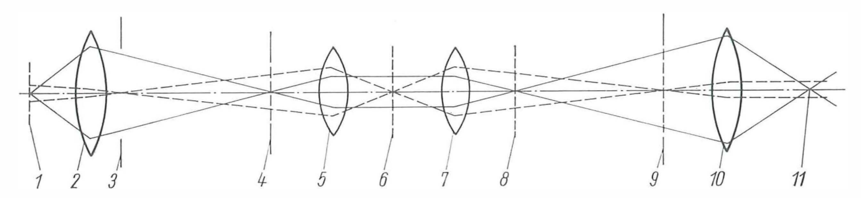


Bild 6.2. Strahlengang zur Durchführung des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens

1 Lichtquelle; *2* Kollektor; *3* Leuchtfeldblende; *4* Aperturblende; *5* Kondensor; *6* Objektebene; *7* Objektiv; *8* Austrittspupille des Objektivs; *9* Zwischenbildebene; *10* Okular; *11* Austrittspupille des Mikroskops

Beleuchtungsapertur nicht beeinflußt wird, tritt keine Beeinträchtigung des Auflösungsvermögens ein.

Die Bildhelligkeit ändert sich, wie noch gezeigt werden wird, mit dem Quadrat der Beleuchtungsapertur. Man sollte trotzdem die Aperturblende niemals zur Regulierung der Bildhelligkeit benutzen, weil sich damit auch der Bildcharakter und das Auflösungsvermögen ändern. Statt dessen werden Dämpfungsfilter in Form von Neutralgläsern empfohlen. Wieweit die Beleuchtungsapertur im einzelnen eingeschränkt werden muß, hängt von den Präparateigenschaften ab. Im Hellfeld werden solche Präparate untersucht, bei denen sich die darin enthaltenen Objekte oder Objektstrukturen kontrastreich von der Umgebung abheben, seltener von Natur aus, überwiegend nach selektiver Färbung. In solchen Fällen wird man die Beleuchtungsapertur etwa auf $\frac{1}{2}$ bis $\frac{2}{3}$ der Objektivapertur beschränken. Nur bei schlecht kontrastierten Objekten oder zur Erhöhung der Schärfentiefe kann es zweckmäßig sein, mit der Beleuchtungsapertur noch weiter herunterzugehen. Es werden dann, meist durch mangelnde Abbildungsgüte, künstliche Kontraste erzeugt, so daß die Objekte deutlicher sichtbar werden. An die Objekttreue der Abbildung darf man dann keine allzu hohen Anforderungen stellen.

Ein weiteres Mittel zur Kontraststeigerung im Hellfeld und auch zur Steigerung des Auflösungsvermögens ist die schiefe Beleuchtung, die z.B. mit dem Abbeschen Beleuchtungsapparat realisiert werden kann. Bei ihm läßt sich die Apertur-Irisblende *4* (Bild 6.2) seitlich verschieben, so daß bei eingeschränkter Beleuchtungsapertur im Verstellbereich eine Beleuchtung beliebiger Schiefe eingestellt werden kann. Schiefe Beleuchtung sollte man aber nur in Sonderfällen anwenden, weil die hierbei unvermeidliche Bildverfälschung leicht zu Trugschlüssen Anlaß geben kann. Außerdem ist es bei Objekten mit Vorzugsrichtung, wie Gitter, Fasern u.dgl., nicht gleichgültig, unter welchem Azimut ψ (Bild 6.3) das Beleuchtungsbündel einfällt, d.h., welchen Winkel die in die Objektebene projizierten Beleuchtungsstrahlen relativ zu dieser Vorzugsrichtung des Objekts einnehmen. Das Auflösungsvermögen ist am größten, die Bildqualität also am besten, wenn das Azimut 90° beträgt, d.h., wenn die Beleuchtungsstrahlen senkrecht auf die Vorzugsrichtung, z.B. die Striche eines Gitters im Bild 6.3, einfallen. In diesem Fall ist die Beugungswirkung am größten, und die Steigerung des Auflösungsvermögens durch schiefe Beleuchtung kann optimal genutzt werden. Im anderen Extremfall ($\psi = 0$) tritt in der Einfallsebene überhaupt keine Beugung auf, und die Gitterstruktur bleibt unsichtbar. Man beobachtet also stets bevorzugt solche Strukturen, die senkrecht zum Beleuchtungsazimut liegen.

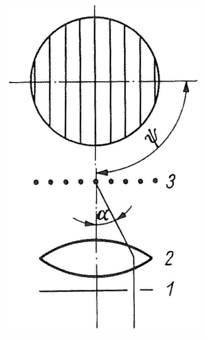


Bild 6.3. Beleuchtungsazimut bei schiefer Beleuchtung
1 Aperturblende; *2* Kondensor; *3* Objektebene

6.1.1.3. Helligkeit des Bilds

Die Helligkeit des Bilds ist zweifellos in jedem optischen Gerät, also auch im Mikroskop, von außerordentlicher, wenn nicht entscheidender Bedeutung. Es gibt einen mittleren Helligkeitsbereich, in dem man ohne Anstrengung, bei optimaler Ausnutzung der im Bild enthaltenen Information, längere Zeit mikroskopieren kann. Bei zu geringer Bildhelligkeit kann das Auge feine Einzelheiten nicht mehr erkennen, weil die Kontrastwahrnehmung erheblich nachläßt und das Auge wegen Überanstrengung sehr schnell ermüdet. Ist die Bildhelligkeit zu groß, dann sind infolge Blendung keine Einzelheiten zu erkennen; außerdem kann das Auge geschädigt werden. Für die visuelle Beobachtung müssen solche Bedingungen geschaffen werden, daß in dem mittleren Helligkeitsbereich gearbeitet werden kann. Bei der Mikrofotografie sind Empfindlichkeit der fotografischen Schicht und Belichtungszeit der Bildhelligkeit anzupassen.

Der Begriff „Helligkeit" wird im täglichen Sprach-

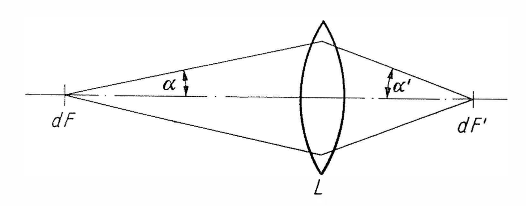


Bild 6.4. Erhaltung der Leuchtdichte bei verkleinerter oder vergrößerter Abbildung eines leuchtenden Flächenelements

gebrauch sowohl für leuchtende Gegenstände, d.h. Lichtquellen, als auch für beleuchtete Gegenstände, wie sie die mikroskopischen Objekte darstellen, und deren Bilder verwendet. Dabei wird die Helligkeit durch das Auge beurteilt. Da es sich jedoch sehr großen Helligkeitsschwankungen anpassen kann, ist es in der Lage, relative Helligkeiten abzuschätzen, das aber nur sehr ungenau. Um die günstigsten Beleuchtungsbedingungen in einem optischen Gerät quantitativ zu erfassen, muß man sich deshalb anderer Begriffe bedienen.

Die Leuchtdichte tritt an die Stelle der Helligkeit. Aus der Definition der Leuchtdichte ergibt sich, daß diese durch eine Abbildung nicht geändert werden kann, wenn man von Energieverlusten auf dem Lichtweg absieht. Das läßt sich unter Verzicht auf eine strenge Ableitung anhand des Bilds 6.4 leicht verständlich machen.

Das strahlende Flächenelement dF werde durch die Linse L auf das Flächenelement dF' verkleinert abgebildet. Damit vergrößert sich die auf die Fläche bezogene Beleuchtungsstärke, weil jetzt die gleiche Strahlungsenergie auf eine kleinere Fläche konzentriert wird. Die auf den Raumwinkel bezogene Leuchtdichte bleibt aber konstant, weil sich bei verkleinerter Abbildung von dF nach dF' der Winkel α' gegenüber α und damit auch der Raumwinkel, in dem die Strahlung einfällt, entsprechend vergrößern.

Auf einer fotografischen Platte wird die Stelle dF' bei Verkleinerung stärker geschwärzt als bei Vergrößerung oder bei einer Abbildung mit dem Maßstab 1:1, und bei visueller Beobachtung erscheint das verkleinerte dF' heller als dF, wenn der durch α' begrenzte Strahlenkegel, mit oder ohne Einschaltung eines optischen Instruments, vollständig vom Auge erfaßt wird. dF' erscheint jedoch bei Verkleinerung mit gleicher Helligkeit wie dF, wenn der Öffnungswinkel des vom Auge aufgenommenen Strahlenkegels nicht größer als α ist.

Zur optimalen Ausnutzung der von der Lichtquelle ausgesandten Strahlungsenergie muß, unter Anwendung des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens, von einer Kollektorlinse ein möglichst großer Strahlenkegel aufgenommen und die Lichtquelle in solcher Größe in die vordere Kondensorbrennebene abgebildet werden, daß sie die im Idealfall dort gelegene und durch Objektivapertur und Kondensorbrennweite bestimmte Eintrittspupille des Mikroskops gerade ausfüllt. Die Lichtquelle wird vergrößert, also mit kleinem Öffnungswinkel abgebildet, so daß die abbildenden Strahlen nahezu vollständig vom Kondensor aufgenommen werden. Größere Lichtverluste treten nur auf, wenn entweder die Lichtquelle wesentlich größer als die Eintrittspupille abgebildet oder ein Objektfeld ausgeleuchtet wird, dessen Größe erheblich über der des Dingfelds liegt. Bei gleicher und unveränderlicher Beleuchtungsoptik ist das jeweils nur für einen Objektivtyp bestimmter Brennweite und Apertur zu erreichen. Denn je größer das Bild der Lichtquelle ist, um so kleiner ist das ausgeleuchtete Objektfeld und umgekehrt. Sollen mit der gleichen Beleuchtungsanordnung sowohl schwache als auch starke Objektive verwendet werden, so sind Verluste nicht zu vermeiden. Man wird die Beleuchtungsoptik so ausführen, daß für das schwächste Objektiv das Dingfeld und für das stärkste Objektiv die Eintrittspupille ausgeleuchtet werden kann. Dann ist im ersten Fall das Bild der Lichtquelle wesentlich größer als die Eintrittspupille und im zweiten Fall das ausgeleuchtete Objektfeld wesentlich größer als das Dingfeld. Zur Erzielung optimaler Bildqualität muß nach Bild 6.2 in dem einen Fall mit der Aperturblende *4* die Beleuchtungsapertur und im anderen Fall mit der Leuchtfeldblende *3* das ausgeleuchtete Feld eingeschränkt werden. Bei mittleren Objektiven sind sowohl die Beleuchtungsapertur als auch das ausgeleuchtete Feld zu beschränken. In allen diesen Fällen geht die abgeblendete Lichtenergie verloren.

Eine bessere Ausnutzung des von der Lichtquelle ausgestrahlten Lichts wird mit einer veränderlichen Beleuchtungsoptik erreicht, wie sie das im Abschn. 2.7. beschriebene pankratische System darstellt. Durch Verschieben von Linsengruppen gegeneinander werden die Größe des Lichtquellenbilds und die des ausgeleuchteten Objektfelds entgegengesetzt geändert, d.h., mit Vergrößerung der Beleuchtungsapertur wird das ausgeleuchtete Feld verkleinert und umgekehrt, so daß die genutzte Lichtenergie nahezu konstant bleibt und eine optimale Anpassung der Lichtquelle an alle Objektive möglich ist.

Im vorangegangenen wurde gezeigt, daß, bei Vernachlässigung von Lichtverlusten, die Leuchtdichte bei einer beliebigen Abbildung ihre Größe nicht ändert und die Bilder gleich hell erscheinen, wenn der gesamte abbildende Strahlenkegel vom Auge erfaßt wird. Das ist jedoch beim Mikroskop nicht der Fall, weil der vom Auge aufgenommene Strahlenkegel durch die Austrittspupille des Mikroskops festgelegt wird. Ihre Größe variiert bei gleicher Leuchtdichte im Bereich der förderlichen Vergrößerung nur um den Faktor 2 und ist

normalerweise kleiner als die wirksame Augenpupille. Es läßt sich zeigen, daß die Helligkeit des visuellen Bilds, bei gleicher Lichtquelle und Beleuchtungsoptik, nur von der Fläche des ausgeleuchteten Teils der Austrittspupille des Mikroskops abhängt. Bei der Mikrofotografie und Mikroprojektion hängt die Helligkeit, wie im Abschn. 8. gezeigt wird, außerdem noch von der Projektionsentfernung ab.
Der Radius der Austrittspupille ist

$$r_{AP} = f_{Mikr} A_{Bel} = k \frac{A_{Bel}}{V_{Mikr}}$$

und ihre Fläche

$$\pi r_{AP}^2 = \pi k^2 \frac{A_{Bel}^2}{V_{Mikr}^2};$$

f_{Mikr} Gesamtbrennweite des Mikroskops,
V_{Mikr} Vergrößerung des Mikroskops,
A_{Bel} wirksame Beleuchtungsapertur, die im Maximum gleich der Objektivapertur ist,
k konventionelle Sehweite von 250 mm.

Man sieht aus der Gleichung, daß die Helligkeit des Bilds mit dem Quadrat der Objektiv- bzw. Beleuchtungsapertur zu- und mit dem Quadrat der Vergrößerung abnimmt. Man erkennt daraus auch die Bedeutung der bei den apochromatischen Objektiven vorhandenen großen Aperturen für die Bildhelligkeit. Zum Beispiel ist bei gleicher Vergrößerung das mit einem Apochromaten 40/0,95 erhaltene Bild mehr als doppelt so hell als das mit einem Achromaten 40/0,65 erzeugte. Alle Optikkombinationen, für die das Verhältnis A_{Bel}/V_{Mikr} konstant ist, liefern gleich helle Bilder.
Die hier durchgeführten Betrachtungen über die Bildhelligkeit gelten in dieser Form nur für die Hellfeldmikroskopie. Sie können aber sinngemäß auf andere Beleuchtungs- bzw. Beobachtungsverfahren, wie Dunkelfeld-, Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie, übertragen werden, wenn man die bei diesen Verfahren vorgenommenen Eingriffe in den Beleuchtungs- bzw. Abbildungsstrahlengang entsprechend berücksichtigt.

6.1.1.4.
Praxis der Hellfeldmikroskopie

Wahl der optischen und mechanischen Ausrüstung

Wie aus Abschn. 2. zu ersehen ist, gibt es eine große Auswahl von Kondensoren, Objektiven und Okularen verschiedenster Eigenschaften. Diese Vielfalt ist die Folge der zahlreichen Arbeitsgebiete der Mikroskopie mit ihren unterschiedlichen Geräteforderungen. Um eine kleine Hilfe bei der Zusammenstellung der für jedes Arbeitsvorhaben optimalen Ausrüstung zu geben, sollen im folgenden einige Regeln aufgestellt werden, die sich in der Praxis an vielen Stellen bewährt haben. Die erste und wichtigste lautet: Die Kombination von Optiksystemen verschiedener Hersteller ist nicht zu empfehlen. Kollektor, Kondensor, Objektive und Okulare oder Projektive, dazu u. U. Zwischenabbildungsoptik, Vergrößerungsschnellwechsler usw. bilden bei jedem Hersteller ein einheitliches System, das nach einer wohldurchdachten Konzeption konstruiert wurde und in das man nicht ungestraft Fremdkörper einfügen kann. Dieser Hinweis gilt auch, wenn die Erzeugnisse verschiedener Firmen zahlenmäßig gleiche Eigenschaften haben, also z. B. Achromate für Tubuslänge 160 mm und Deckglasdicke 0,17 mm sind. Diese beiden Werte reichen aus, um die Objektive für den Benutzer ausreichend zu kennzeichnen, sie sagen aber nichts aus über die Verteilung der Wirkung der Korrektionsmittel auf Objektiv und Okular. Um ohne Einbuße an Bildgüte in ein solches System ein fremdes Objektiv oder Okular einführen zu können, bedarf es der Kenntnis von sehr viel Einzelheiten der optischen Konstruktion, über die der praktische Mikroskopiker nicht verfügt.
Eine weitere wichtige Grundregel fordert, daß man sich bei der Wahl einer optischen Ausrüstung an die Vorschriften des Herstellers über die Kombinationsmöglichkeiten von Einzelsystemen hält. Jeder Hersteller ist bestrebt, dem Benutzer das Bestmögliche zur Verfügung zu stellen. Man kann also immer mit sachgemäßer Beratung rechnen, wenn man dem Lieferwerk klare Informationen über das vorgesehene Anwendungsgebiet der gewünschten Geräte gibt.
In der Mehrzahl der Fälle, z. B. wenn es sich um die Ausstattung von Kursräumen oder Routinelaboratorien handelt, kann man die Wahl einer der von vielen Herstellern angebotenen „Grundausrüstungen“ ins Auge fassen. Selbstverständlich bestehen auch Möglichkeiten zur Änderung solcher Ausrüstungen nach Maßgabe besonderer Verhältnisse.
Für Kursmikroskope des Anfängerpraktikums lohnt z. B. die Anschaffung von Immersionsobjektiven nicht, auch für histologische Kurse kommt man im allgemeinen mit starken Trockensystemen aus. Es sei in diesem Zusammenhang auf die stärksten apochromatischen Trockensysteme hingewiesen, die bei Aperturen über 0,90 Gesamtvergrößerungen bis 1000 × zulassen.

Anders liegen die Verhältnisse in Zytologie und Mikrobiologie, die auf die stärksten erreichbaren Gesamtvergrößerungen und damit auf die Verwendung von Immersionssystemen angewiesen sind.

Für einen geübten Mikroskopiker ist das Arbeiten mit einem Immersionsobjektiv kaum schwieriger als mit einem Trockenobjektiv. Es ist lediglich darauf zu achten, daß das mit einem Deckglas versehene Präparat in ein Medium eingebettet wurde, dessen Brechzahl nicht zu stark von der des Deckglases abweicht, und das vorgeschriebene Immersionsöl blasenfrei zwischen Deckglas und Objektivfrontlinse gebracht wird. Für Kurse aller Art in Histologie und Mikrobiologie sind achromatisch korrigierte Objektive ausreichend, auch für routinemäßige Laboruntersuchungen genügen sie. Anders dort, wo die Unterscheidung sehr feiner Farbnuancen wichtig ist, z.B. bei histochemischen oder histopathologischen Untersuchungen. Hierfür ist höher korrigierten Systemen, also Fluoritsystemen oder Apochromaten, der Vorrang einzuräumen. Auch für sämtliche fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sollten Apochromate benutzt werden, weil ihre überlegene Farbkorrektion und die durch hohe Aperturen bedingte große Bildhelligkeit die besonderen Eigenarten der Fluoreszenzbilder, starker Farbkontrast bei relativ geringer Intensität und der Eindruck des Strahlenden im Bild des selbstleuchtenden Objekts, optimal wiedergeben.

Für Beobachtungen unter Ausnutzung der höchsten Auflösung, z.B. an Diatomeenschalen, sehr kleinen Algen oder Bakterien, ist man ebenfalls auf die apochromatische Ölimmersion angewiesen; denn nur mit den hohen Aperturen der Apochromate ist die Grenze der Auflösung des Lichtmikroskops zu erreichen.

Eine weitere Regel für die mikroskopische Beobachtung sagt, daß man jede Arbeit mit dem schwächstmöglichen Objektiv erledigen sollte. Die Befolgung dieser Regel bringt vor allem den Vorteil, daß man mit größtmöglichem freiem Arbeitsabstand und großem Sehfeld beobachtet und sich dadurch die Handhabung des Mikroskops erleichtert. Weiterhin gewinnt man bei Benutzung schwächerer Objektive an Schärfentiefe (s.a. Abschn. 2.), ein Vorteil, der bei der Beobachtung von Schnittpräparaten nicht zu vernachlässigen ist.

Eine bestimmte notwendige oder angestrebte Gesamtvergrößerung ist in der Regel mit mindestens zwei Objektiv-Okular-Kombinationen zu erreichen. Bei hoher Auflösung sind starke Objektive erforderlich, benötigt man hohe Schärfentiefe, so empfiehlt sich das schwächere Objektiv, das dann auch den bequemeren Arbeitsabstand bietet. Die endgültige Entscheidung wird vom Untersuchungsvorhaben vorgeschrieben.

Die Verwendung von herkömmlicher oder Planoptik hängt von den gewählten Untersuchungsmethoden ab. Für ausschließlich visuelle Beobachtungen reichen herkömmliche Objektive völlig aus. In allen Fällen aber, in denen an eine Dokumentation durch Zeichnung, Projektion, Foto oder Kinematografie gedacht ist, sind Planobjektive am Platz. Vor allem für die Mikroprojektion und Mikrofotografie sollte man heute nur noch Planoptik benutzen.

Bei allen mikroskopischen Untersuchungsarbeiten spielt neben dem Objektiv das Okular oder Projektiv eine maßgebliche Rolle. Man sollte es sich zur Gewohnheit machen, die Hinweise über richtige und falsche Objektiv-Okular-Kombinationen zu beachten, die in den Druckschriften und Gebrauchsanleitungen der Herstellerwerke gegeben werden. Im allgemeinen sind bestimmte Okulare bestimmten Objektivtypen korrektionsmäßig zugeordnet, und Verstöße gegen die dadurch bedingten Benutzungsvorschriften verursachen Störungen im Korrektionszustand, wie Farbsäume, Schleier und Unschärfen.

Für den vorteilhaften Einsatz eines korrektionsmäßig zulässigen Okularsatzes in der Praxis gibt es einige Regeln und Hinweise, deren Beachtung sich lohnt. Nächst dem Korrektionszustand richtet sich die Auswahl der Okulare nach den Grenzen des Bereichs der förderlichen Vergrößerung (s.a. Abschn. 3.2.4.). Starke Okulare sind auch wegen der häufig relativ niedrig über dem Okulardeckel liegenden Austrittspupille unbequem bei der Beobachtung.

Für Brillenträger, die aus Korrektionsgründen stets mit Brille mikroskopieren sollten, ist die Lage der Austrittspupille von besonderer Bedeutung. Bei richtiger Lage des Auges zum Okular liegt die Austrittspupille des Mikroskops im Augendrehpunkt. Bei Okularen normaler Pupillenlage reicht dann der Abstand vom Okulardeckel bis zum Auge nicht mehr für ein Brillenglas aus; die Folge ist, daß die Brillengläser auf dem Okulardeckel aufsitzen, verkratzt werden und der Sitz der Brille beeinträchtigt wird. Unangenehm ist auch eine weitere Folge dieser Situation, die sog. Schlüssellochbeobachtung. Das Auge steht dabei, bedingt durch den Raumbedarf der Brille, so weit von der Austrittspupille ab, daß man nicht mehr das ganze vom Okular dargebotene Feld ohne Augen-

bewegung übersehen kann. Der Versuch, diesen Schwierigkeiten durch Abnehmen der Brille zu begegnen, beschwört neue herauf, wenn der Beobachter genötigt ist, zwischendurch Notizen zu machen oder zu skizzieren, wozu er seine Brille braucht. Das mehrfache Ab- und Aufsetzen der Brille und die damit verbundene Umstellung der Augen ist ein nicht zu übersehender Ermüdungsfaktor.
Der Ausweg aus allen diesen Schwierigkeiten heißt: Okulare für Brillenträger. Solche Okulare sind mit besonders hoher Lage der Austrittspupille konstruiert und ermöglichen das Tragen der Brille bei der Beobachtung. Die Gefahr des Verkratzens der Brillengläser wird durch Gummiringe auf den Okularen beseitigt. Brillenträgerokulare haben mittlere Eigenvergrößerungen von 8× bis 10×, sind also für sehr viele Untersuchungsvorhaben verwendbar.
Bei allen Überlegungen zur Okularwahl müssen etwa vorhandene Tubusfaktoren berücksichtigt werden, jedoch ist dabei zu beachten, daß derartige Faktoren nur auf die Vergrößerung oder den Maßstab einwirken und bei Überlegungen hinsichtlich Auflösung und Arbeitsabstand außer Betracht bleiben. Die Wahl der günstigsten Beleuchtungsoptik hängt wesentlich von der Qualität der abbildenden Optik ab. Besonders die Eigenschaften des Kondensors verdienen Beachtung, weil sich für bestimmte Zwecke optimale Kombinationen zwischen Kondensoren und Objektiven ergeben. Bestimmend für den Einsatz von Hellfeldkondensoren sind Korrektionszustand, Schnittweite und Apertur.
Für die weitaus überwiegende Anzahl der Hellfelduntersuchungen genügt ein Kondensor der Apertur 0,8 bis 0,9, der ohne Immersion benutzt werden kann. Kondensorimmersion wird erst dann erforderlich, wenn die höchste Auflösung des Mikroskops restlos ausgeschöpft werden soll. Es ist in solchem Fall sinnvoll, auch einen Kondensor höchster Apertur, also 1,3 bis 1,4, zu nehmen und als Immersionsmittel Öl und nicht Wasser oder Glyzerin zu benutzen.
Bei Anwendung der schiefen Beleuchtung zum Erhöhen der Auflösung müssen Objekt oder Aperturblende um mindestens 90° gedreht werden können, da nach Abschn. 6.1.1.2. und Bild 6.3. die Auflösung vom Beleuchtungsazimut abhängt. Erst die Summe der dabei beobachteten Einzelheiten ergibt ein Bild von der Objektstruktur im Auflösungsbereich des Lichtmikroskops. Charakteristische Objekte für die Anwendung der schiefen Beleuchtung sind Strukturen von Kieselalgen und Foraminiferenschalen, Bakteriengeißeln u.ä.
Eine Hauptschwierigkeit, mit der die Praxis häufig zu kämpfen hat, ist die Ausleuchtung der unterschiedlich großen Felder verschiedener Objektive mit einem vorhandenen Kondensor. Die üblichen Hellfeldkondensoren der Apertur 0,9 bis 1,4 leuchten die Felder mittlerer und starker Objektive bei Einhaltung der Regeln des Beleuchtungsprinzips nach *Köhler* ohne Mühe aus. Schwierigkeiten beginnen dann, wenn mit dem gleichen Kondensor die Felder schwacher Objektive ausgeleuchtet werden sollen, d.h., wenn das Übersichtsbild im Vordergrund steht. In den Abschnitten 2. und 4. sind Varianten zur Beseitigung dieser Schwierigkeiten beschrieben worden.
Schließlich bleibt immer noch die Möglichkeit, mehrere Kondensoren unterschiedlicher Apertur und Brennweite zu verwenden.
Eine für viele, vor allem für visuelle Beobachtungen sehr bequeme Beleuchtungseinrichtung ist die schon im Abschn. 6.1.1.3. erwähnte Beleuchtungspankratik. Fügt man dieser noch einen Kondensorschnellwechsler bei, so ergibt sich ein für die Belange der Hellfeld-, Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskopie geeignetes Beleuchtungssystem.

Köhler-Beleuchtung [53]

Es soll nun hier eine allgemeine Anleitung zur praktischen Realisierung dieses Verfahrens gegeben werden, die mit geringen konstruktionsbedingten Variationen auf alle Durchlichtmikroskope angewendet werden kann.
Voraussetzung für die Durchführung des Verfahrens ist eine Mikroskopierleuchte mit Fokussiervorrichtung, Kollektor und Irisblende.
Zweite Voraussetzung ist ein Mikroskop mit fokussierbarem Kondensor mit Irisblende.
Zur notwendigen Vorbereitung gehört die Justierung der Leuchte, d.h. die Ausrichtung des Leuchtkörpers und gegebenenfalls des Spiegels hinter der Lampe zur optischen Achse der Leuchte. Die erforderlichen Handgriffe sind der Bedienungsanleitung der Herstellerfirma zu entnehmen. Weiterhin ist der Kondensor des Mikroskops an den oberen Anschlag zu stellen und seine Irisblende zu schließen.
Als erster Schritt zur Darstellung der Beleuchtungsführung nach *Köhler* wird das aus der Leuchte austretende Lichtbündel auf die Mitte des Umlenkspiegels des Mikroskops gerichtet. Die Leuchtfeldblende wird dabei so weit geschlossen, daß der Lichtfleck bequem zu erkennen

ist. Das Licht wird dann mit dem vorgesehenen Justiermittel auf die geschlossene Kondensorblende geleitet. Dort bildet man mit der Fokussiervorrichtung der Leuchte den Leuchtkörper der Lampe – Glühwendel, Lichtbogen – auf die Kondensorblende ab. Letztere wird zweckmäßig über einen Taschenspiegel beobachtet, den man neben den Umlenkspiegel auf den Tisch oder Stativfuß legt. Wird mit einer Leuchte auf Stativ gearbeitet, so ist deren Abstand – falls nicht durch eine Abstandsschiene vorgegeben – so zu bemessen, daß das Leuchtkörperabbild die Kondensoröffnung weitgehend ausfüllt.
Man hat mit den bis hierher durchgeführten Manipulationen eine stellvertretende Lichtquelle in der Ebene der Kondensorblende, die der Eintrittspupille des Mikroskops entspricht, erzeugt. Wenn die Wendelstruktur des Glühdrahts im mikroskopischen Bild „durchschlägt", wird durch Einführen einer Mattscheibe zwischen Lampe und Kollektor die störende Struktur des Leuchtkörperbilds ausgelöscht. Die Mattscheibe erzeugt eine homogene Beleuchtung. Die Mattgläser handelsüblicher Mikroskopbeleuchtungen sind so ausgelegt, daß die Leuchtkörperstruktur völlig verwischt wird, aber nur das unvermeidbare Mindestmaß an Energie verlorengeht. Sollte die hieraus resultierende Beleuchtungsstärke für visuelle Beobachtung noch zu hoch sein, kann man mit Dämpfungsfiltern, Farbfiltern, dichteren Mattscheiben oder Opalfiltern Abhilfe schaffen. Die Herabsetzung der Beleuchtungsstärke durch Drosseln der Versorgungsspannung der Lampe ist nur dort möglich, wo die Lampe derartige Maßnahmen zuläßt und die damit verbundene Änderung der Farbtemperatur (s. Abschnitt 5.) den Bildcharakter, wie u. U. bei Farbaufnahmen, nicht stört.
Als nächste Stufe zur Realisierung des Köhlerstrahlengangs fokussiert man ein mittelstarkes Objektiv auf ein gut erkennbares Objekt. Hierbei kann die Kondensorblende etwas geöffnet werden, wenn die Bildhelligkeit nicht ausreicht. Vorteilhaft ist die Verwendung eines schwachen Okulars, weil es ein großes Feld bietet, in dem man das vorläufig noch unscharfe Bild der Leuchtfeldblende leichter findet. Sie ist als heller Fleck mit unscharfen Rändern dem Bild des Objekts überlagert. Durch Höhenverstellung des Kondensors wird dieses Blendenbild scharfgestellt. Durch Verstellen der Leuchtfeldblende ist zu erkennen, daß man tatsächlich ein Bild dieser Blende sieht. Farbsäume am Blendenbild sind auf chromatische Restfehler des Kondensors zurückzuführen. Sie verlieren bei der Durchführung der nächsten Handgriffe ihre Wirksamkeit. Das gleiche gilt für Nebenbilder der Leuchtfeldblende, die durch mehrfache Reflexion an rückseitig belegten Umlenkspiegeln entstehen.
Das Leuchtfeldblendenbild wird mit den Justiermitteln des Umlenkspiegels oder des Kondensors in die Mitte des Dingfelds gerückt und danach die Blende so weit geöffnet, daß ihr Bild gerade hinter dem Dingfeldrand verschwindet. Dabei verschmelzen etwa aufgetretene Nebenbilder mit dem Hauptbild, und die Farbsäume verschwinden.
In diesem Zustand kann es zu einer störenden Abbildung der Mattscheibenstruktur in das Objekt kommen, weil es technisch nicht möglich ist, die Mattscheibe an die theoretisch optimale Stelle zu bringen. Diese Störung kann meist durch geringes Absenken des Kondensors, bei unmerklicher Beeinflussung des Beleuchtungsstrahlengangs, beseitigt werden.
Als letzte Maßnahme ist die als Aperturblende wirkende Kondensorblende einzustellen. Zur Kontrolle entfernt man ein Okular und betrachtet das in der hinteren Brennebene des Objektivs liegende Bild dieser Blende, das i. allg. zur Verbesserung des Kontrasts auf 1/2 bis 2/3 des Durchmessers der Objektivpupille eingestellt wird. Bei Beginn der Beobachtung eines neuen Objekts prüft man durch Vergleich des Blenden- und der Qualität des zugeordneten Objektbilds die Wirkung der Blende nach. Man kann so lernen, die Blende auch nach dem Bildeindruck optimal einzustellen. Folgende Fehler der Aperturblendeneinstellung sind möglich:

Blende zu eng

Folgen: eingeschränkte Beleuchtungsapertur mit verminderter Auflösung. Die obere Grenze der förderlichen Vergrößerung wird früher erreicht und die mit der Übervergrößerung entstandenen Störerscheinungen werden sichtbar. Auftreten von Beugungsstreifen an Kanten des Objekts, die nicht vorhandene Struktureinzelheiten vortäuschen können.

Blende zu weit

Folgen: Objekt durch zu große Beleuchtungsapertur überstrahlt, Kontrast gering, so daß feinere Einzelheiten übersehen werden, verminderte Schärfentiefe.
Bei Objektivwechsel wird u. U. vergessen, die Aperturblende der neuen Objektivapertur anzupassen. Als Folgen ergeben sich die eben ge-

schilderten Erscheinungen in mehr oder minder ausgeprägter Form.
Hat man das Köhler-Prinzip erst einmal mit einem mittleren Trockensystem eingestellt, ist die Anpassung an stärkere oder schwächere Objektive nicht schwer. Die Höheneinstellung des Kondensors bleibt im allgemeinen erhalten; Größe von Leuchtfeld- und Aperturblende werden den Erfordernissen entsprechend korrigiert.

6.1.2. Phasenkontrast und Dunkelfeld

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

6.1.2.1. Allgemeine Grundlagen [64]

Für die einwandfreie Hellfeldabbildung eines mikroskopischen Präparats, z.B. eines Dünnschnitts oder Ausstrichs, müssen sich die in ihm enthaltenen Objekte und Objektstrukturen kontrastreich von der Umgebung abheben. Sie müssen das hindurchgelassene Licht mehr oder weniger schwächen als die Umgebung, weil das menschliche Auge nur Helligkeits- oder Farbunterschiede wahrnehmen kann. Da nach der Wellenvorstellung vom Licht jede Intensitätsänderung einer Amplitudenänderung entspricht, sprechen wir in diesem Fall von Amplitudenobjekten.
Die meisten der die Mikroskopiker interessierenden Präparate, besonders biologische und medizinische, liefern in der für die Erzeugung eines einwandfreien Bilds notwendigen Dicke den erforderlichen Kontrast nicht und müssen erst angefärbt oder mit Hilfe einer besonderen optischen Methode, z.B. im Phasenkontrast oder Dunkelfeld kontrastiert werden. Sie unterscheiden sich im ungefärbten Zustand lediglich durch ihre Dicke oder Brechzahl von der Umgebung. Beide wirken auf die Phase der hindurchgehenden Lichtwelle (s. Bild 3.1), so daß wir in diesem Fall von Phasenobjekten sprechen. Im Bild 6.5 soll das noch einmal veranschaulicht werden.
Eine ebene Welle sei in drei Teilwellen aufgespaltet, die vor Durchdringen der Objektebene gleiche Amplitude und Phase haben, was entsprechend den Bildern 3.1 und 3.2 aus Abschn. 3.2. durch Betrag und Richtung der drei linken Zeiger angedeutet ist. Nachdem die erste Teilwelle in der homogenen Umgebung des Objekts eine ganze Anzahl von Wellenlängen weitergelaufen ist, hat der Zeiger in a) wieder gleiche Größe und Richtung. Die zweite Teilwelle habe ein Amplitudenobjekt passiert und dabei keinen Gangunterschied relativ zu a) erhalten, so daß der Zeiger in b) rechts mit dem Zeiger in a) in der Richtung übereinstimmt, aber nicht in der Länge. Durch Verminderung der Intensität ist die Wellenamplitude kleiner geworden. Nach Durchlaufen des Phasenobjekts hat die dritte Teilwelle in c) gleiche Amplitude wie die durch die homogene Umgebung gegangene Teilwelle in a), doch ihre Phase hat sich geändert, was durch eine andere Richtung des Zeigers angedeutet ist.
Will man die organische Materie im Naturzustand untersuchen, z.B. Wachstumsprozesse, und im

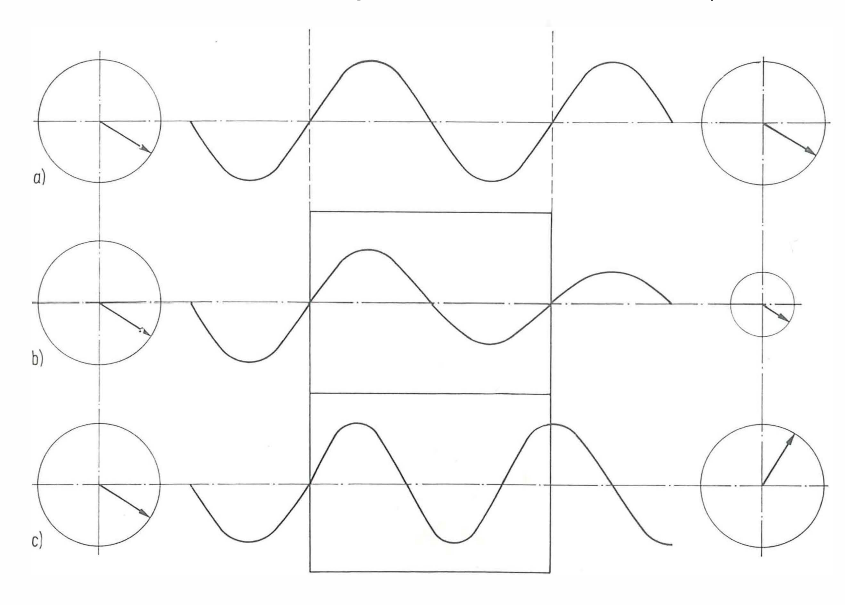


Bild 6.5
Zur Wirkung von Amplituden- und Phasenobjekten auf eine hindurchgehende Lichtwelle
a) homogene Umgebung
b) Amplitudenobjekt
c) Phasenobjekt

Zusammenhang damit den Stoffwechsel der lebenden Zelle beobachten, so ist die Benutzung der üblichen Anfärbemethode nicht möglich, weil hierbei Veränderungen der Substanzen und im Zusammenhang damit Schädigungen der biologischen Objekte nicht zu vermeiden sind, die bei lebenden Objekten häufig zu deren schnellem Absterben führen.
Das Kontrastproblem ist für die mikroskopische Abbildung, wie *Haselmann* [84] treffend bemerkt, erst mit der entscheidenden Verbesserung der Mikroskopoptik immer kritischer geworden. Denn die primäre Aufgabe des Mikroskops ist es, feine und feinste Objektdetails möglichst objektgetreu und stark vergrößert wiederzugeben. Das heißt aber andererseits, daß unsichtbare Objekte auch unsichtbar bleiben. Bei weniger guten Mikroskopen oder auch bei Defokussierung eines guten Mikroskops weicht das Bild aber stark von diesem Idealzustand ab, so daß auch Phasenobjekte, allerdings auf Kosten feinster Einzelheiten, sichtbar werden. Eine weitere Kontrastverbesserung wird durch die schon erwähnte schiefe Beleuchtung und schließlich durch die Dunkelfeldbeobachtung erreicht. Das Grundprinzip der letzteren kann durch den im Bild 6.6 gezeigten Strahlengang erläutert werden.

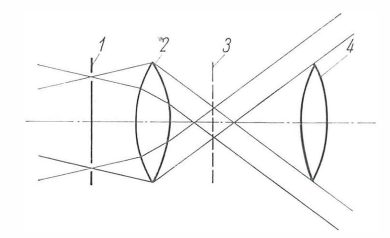


Bild 6.6. Grundprinzip des Dunkelfeldstrahlengangs
1 Ringblende; *2* Kondensor; *3* Objektebene; *4* Objektiv

Man kann z. B. als Aperturblende eine Ringblende *1* verwenden, deren innerer Durchmesser größer als die Eintrittspupille ist. Dann gelangen die von ihr ausgehenden, im Objektraum parallelen Strahlen nicht in das Objektiv *4*, d.h., die Beleuchtungsstrahlen sind stärker geneigt, als es der Objektivapertur entspricht, so daß das gesamte Dingfeld, wenn kein Objekt vorhanden ist, dunkel erscheint. Nur Licht, das durch Brechung, Reflexion oder Beugung von seiner Richtung abgelenkt wird, kann ins Objektiv eintreten und zur Bildentstehung beitragen. Da bei mikroskopischen Objekten die Beugung die Hauptrolle spielt, leuchten alle feinen Strukturen und die Kanten flächenhafter Objekte auf dunklem Grund hell auf.
Diese Dunkelfeldanordnung hat jedoch Nachteile, deren wesentlichster darin besteht, daß an den Linsenflächen des Kondensors Reflexe entstehen, die eine, wenn auch geringe Aufhellung des Felds verursachen. Deshalb verwendet man heute für eine leistungsfähige Dunkelfeldanordnung Spiegelkondensoren, z. B. den Kardioidkondensor (vgl. Bild 2.57).

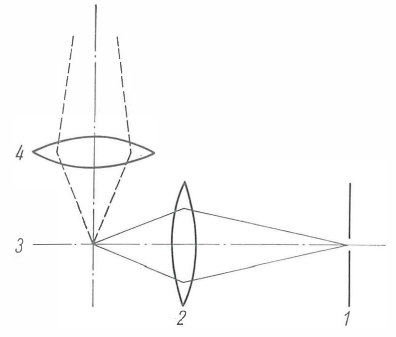


Bild 6.7. Beleuchtung beim Spaltultramikroskop
1 Spaltblende; *2* Kondensor; *3* Objektebene; *4* Objektiv

Bahnbrechende Erfolge auf dem Gebiet der Kolloidchemie sind mit einer anderen Dunkelfeldanordnung, dem sog. Spaltultramikroskop, erreicht worden. Bei ihm wird im Bild 6.7 durch einen senkrecht zum Abbildungsstrahlengang liegenden Beleuchtungsstrahlengang eine intensiv beleuchtete Spaltblende *1* stark verkleinert in die Objektebene *3* abgebildet. Da, in Richtung der optischen Achse gesehen, stets nur ein kleiner Bereich beleuchtet wird, erreicht man mit einem Minimum an störendem Streulicht eine ausgezeichnete Dunkelfeldabbildung und kann so noch Teilchen sichtbar machen, deren Größe um einige Zehnerpotenzen unter der Auflösungsgrenze liegt. Heute ist diese Anordnung jedoch kaum noch in Gebrauch. Sie ist vor allem von dem Kardioidkondensor verdrängt worden, der eine etwa 20mal höhere Bildintensität liefert. Eine weitere Dunkelfeldanordnung, das zentrale Dunkelfeld, wird später im Zusammenhang mit dem Phasenkontrastverfahren behandelt.
Der eigentliche Durchbruch für die mikroskopische Abbildung ungefärbter Objekte ist erst durch die Einführung des Phasenkontrastverfahrens erzielt worden. Es wurde 1932 von dem holländischen Physiker *Frits Zernike* [120] bis [123] vorgeschlagen und kann als eine konse-

quente Anwendung der Abbeschen Theorie von der Bildentstehung im Mikroskop auf nichtabsorbierende Objekte angesehen werden.
Der Grundgedanke läßt sich im Anschluß an die Gitterabbildung nach Bild 3.11a erläutern. Die Phasendifferenz zwischen der 0. und den höheren Beugungsordnungen beträgt für das Amplitudengitter 180°, für das Phasengitter bei geringer Steghöhe (Bild 6.8) 90°. Um aus dem kontrastlosen Phasengitter in der Objektebene ein kontrastreiches Amplitudengitter in der Bildebene zu machen, ist es demnach nur erforderlich, die 0. Beugungsordnung relativ zu den höheren Beugungsordnungen in der Phase um 90° zu drehen, so daß, ebenfalls wie beim Amplitudengitter, eine Phasendifferenz von 180° besteht. Der Versuch im Bild 3.11e ist dahingehend abzuändern, daß die 0. Beugungsordnung nicht mehr durch einen undurchsichtigen Steg unterdrückt, sondern mit einem durchsichtigen Steg (Bild 6.9) in der Phase gedreht wird.



Bild 6.8. Amplituden- und Phasengitter

Der Vergleich zwischen Amplituden- und Phasengitter ist im Zusammenhang mit den Abbeschen Versuchen sehr anschaulich und war auch der Ausgangspunkt der Zernikeschen Überlegungen. Doch zu einer allgemeineren Begründung des Phasenkontrastverfahrens ist dieser Vergleich ungeeignet und führt erfahrungsgemäß oft zu Trugschlüssen, die vor allem darin begründet sind, daß beim Gitter die 0. Beugungsordnung mit dem direkten, ungebeugten Licht übereinstimmt. Bei beliebigen Objekten ist das aber nicht der Fall. Hier ist nicht die Unterscheidung zwischen der 0. und den höheren Beugungsordnungen, sondern zwischen dem direkten und dem gebeugten Licht wesentlich. Es soll deshalb bei der Begründung des Phasenkontrastverfahrens ein etwas allgemeinerer Weg eingeschlagen werden.

Bild 6.9. Phasensteg zur Beeinflussung der 0. Beugungsordnung

Ausgehend von der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung (Bild 6.2), verwendet man zunächst als Aperturblende eine kleine Zentralblende *1*, auf die die Lichtquelle abgebildet wird (Bild 6.10). Die von jedem Punkt dieser Blende ausgehenden Strahlen durchsetzen als Parallellichtbündel die Objektebene *3*. Ein solches Bündel entspricht einer ebenen Welle, d.h., der Schwingungszustand ist zu einem beliebigen Zeitpunkt an allen Orten einer senkrecht zur Strahlrichtung gelegenen Ebene der gleiche, was durch die drei zueinander parallelen Pfeile unterhalb der Objektebene angedeutet ist. Diese Pfeile stellen also keine Lichtrichtungen, sondern die relative Phasenlage und ihre Länge die relative Amplitude des Schwingungszustands dar. Sie sind Vektoren, da sie erst durch Richtung und Betrag eindeutig bestimmt sind.
Ist in der Objektebene kein Objekt vorhanden, dann wird das gesamte von der Zentralblende *1* ausgehende Licht in der Objektivbrennebene *6* vereinigt; von dort aus verteilt es sich gleichmäßig über den ausgeleuchteten Teil der Zwischenbildebene *8*. Ein in der Objektebene befindliches kleines Objekt *4* lenkt einen Teil des Lichts durch Beugung aus seiner Richtung ab, das durch das Objektiv auf dem Bildort *4'* vereinigt wird. Dort entsteht durch Interferenz zwischen direktem *10* und gebeugtem *9* Licht das Bild *4'* des Objekts *4*. Um zu einer quantitativen Aussage zu gelangen, betrachten wir zunächst die Vektordarstellung der Wirkung eines Amplituden- und eines Phasenobjekts (Bild 6.11), um dann etwas genauer auf Bild 6.10 einzugehen.
Wir beschreiben den Einfluß des Objekts auf das hindurchgehende Licht durch den Vektor des einfallenden und ungestört hindurchgegangenen Lichts $\mathfrak{r}_u$ und einen Zusatzvektor $\mathfrak{r}_z$, der dem gebeugten Licht entspricht. Beim Amplitudenobjekt ist der Vektor $\mathfrak{r}_z$ dem Vektor $\mathfrak{r}_u$ entgegengesetzt gerichtet (Phasendifferenz = $\pm 180°$), beim Phasenobjekt mit der kleinen relativen Phasendrehung φ stehen beide Vektoren etwa senkrecht aufeinander (Phasendifferenz = $\pm 90°$).
Aus der Dicke d_{Obj}, der Brechzahldifferenz zur Umgebung Δn und der Wellenlänge λ ergibt sich φ zu

$$\varphi = \frac{d_{\text{Obj}}}{\lambda} \Delta n \, 360°.$$

Jedes normale Hellfeldobjektiv hat die Aufgabe, die im Bild 6.11 durch das Objekt hervorgerufenen Amplituden- und Phasenbeziehungen in der Zwischenbildebene zu reproduzieren. Nur für ein Amplitudenobjekt sind die Amplituden und damit auch die Intensitäten im Objekt und in der Umgebung verschieden. Beim Phasenobjekt sind

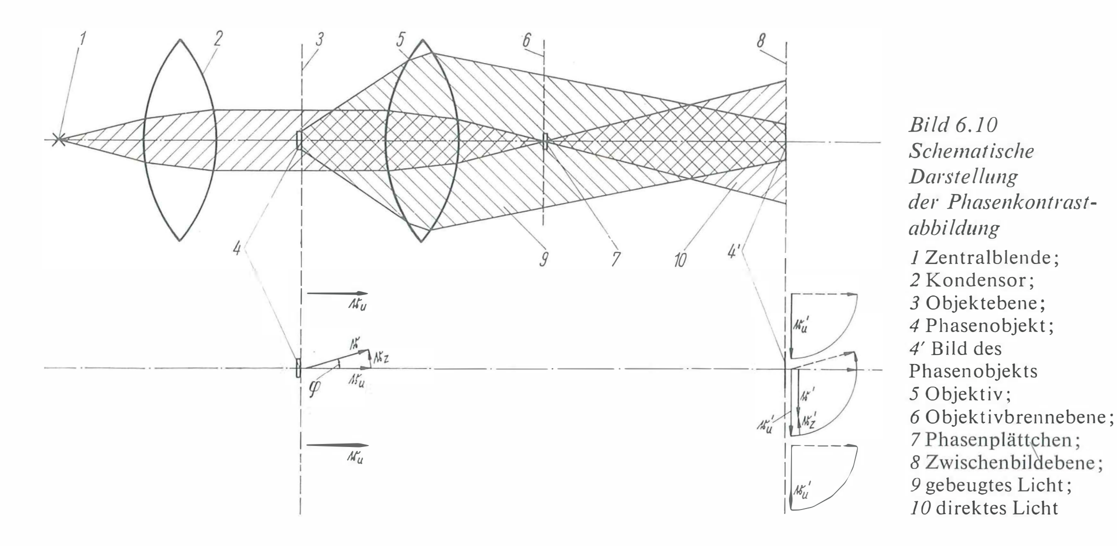


Bild 6.10
Schematische Darstellung der Phasenkontrastabbildung
1 Zentralblende; *2* Kondensor; *3* Objektebene; *4* Phasenobjekt; *4'* Bild des Phasenobjekts *5* Objektiv; *6* Objektivbrennebene; *7* Phasenplättchen; *8* Zwischenbildebene; *9* gebeugtes Licht; *10* direktes Licht

sie gleich, weshalb letzteres unsichtbar bleibt. Wird der Vektor $\mathfrak{r}_z$, d.h. das gebeugte Licht, relativ zum direkten Licht in der Phase um 90° gedreht, so ergeben sich qualitativ die gleichen Verhältnisse wie beim Amplitudenobjekt im Bild 6.11, und das Phasenobjekt erscheint im Bild wie ein Amplitudenobjekt. Beim Gitter ist das leicht zu realisieren, weil direktes Licht (0. Beugungsordnung) und gebeugtes Licht (höhere Beugungsordnungen) räumlich getrennt durch die hintere Objektivbrennebene gehen. Bei einem beliebigen Objekt ist das nicht der Fall, weil z.B. beim Spalt (Bild 3.6) schon die 0. Beugungsordnung dem gebeugten Licht zugeordnet werden muß. Daß trotzdem auch in diesem Fall das direkte Licht weitgehend unabhängig vom gebeugten Licht beeinflußt werden kann, liegt darin begründet, daß das direkte Licht bei genügend kleiner Aperturblende *1* durch einen sehr eng begrenzten Bereich der Objektivbrennebene *6*, nämlich das Bild der Aperturblende, geht, während sich bei genügend kleinem Objekt das gebeugte Licht über einen mehr oder weniger großen Bereich der Objektivbrennebene verteilt. Es ist also nur notwendig, in der Objektivbrennebene ein dem Bild 6.9 entsprechendes Phasenplättchen *7*

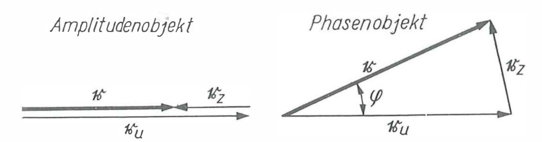
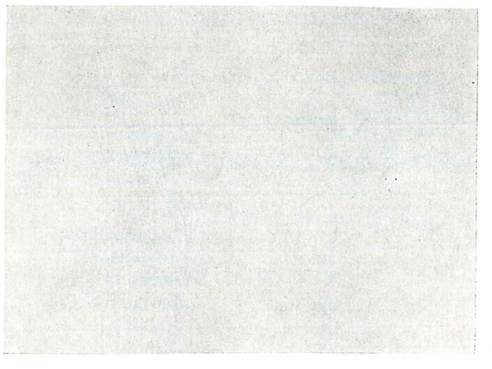
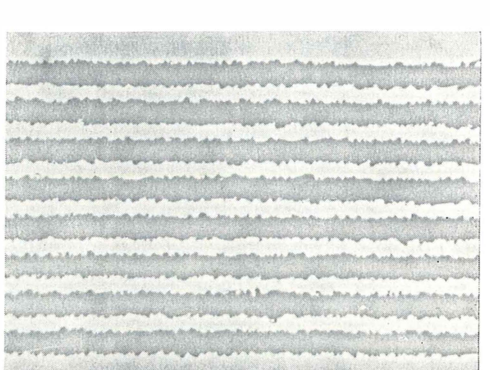
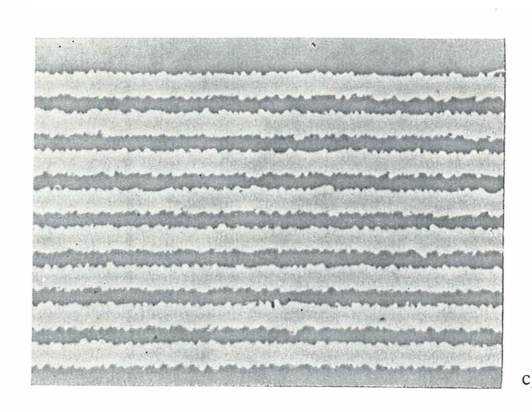


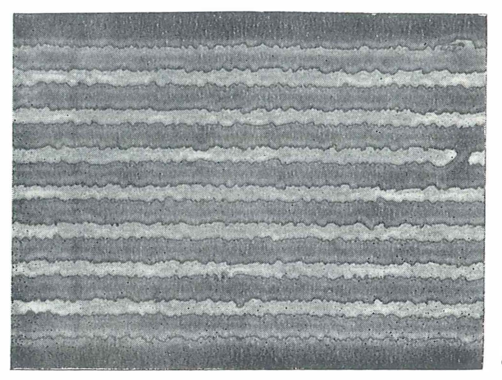
Bild 6.11. Darstellung des durch das Objekt veränderten Lichtvektors mit Hilfe der Vektoren des direkten und gebeugten Lichts

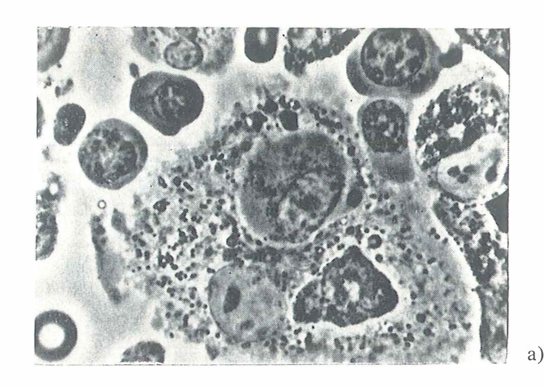
anzubringen, dessen Größe dem Bild der Aperturblende entspricht. Es wird dann zwar immer der dieser Größe entsprechende Teil des gebeugten Lichts mit beeinflußt. Diese Beeinflussung ist jedoch in den praktisch wichtigsten Fällen zu vernachlässigen. Bei der Darstellung des nichtstrengen Zernike-Verfahrens wird darauf noch einmal genauer eingegangen werden. Nach diesen vorangestellten Betrachtungen läßt sich die praktische Realisierung der Phasenkontrastabbildung im Bild 6.10 unschwer erkennen.
Ist das Phasenplättchen niedrigerbrechend als seine Umgebung, dann sprechen wir vom positiven, im anderen Fall vom negativen Phasenkontrast. Beim positiven Phasenkontrast erscheint ein Phasenobjekt mit kleiner relativer Phasendrehung, dessen Brechzahl größer ist als die der Umgebung, dunkel auf hellem Grund, bei negativem Phasenkontrast hell auf dunklem Grund.
Der relative Unterschied zwischen $|\mathfrak{r}'|$ und $|\mathfrak{r}'_u|$, und damit der Bildkontrast, wird größer, wenn man das direkte Licht nicht nur in der Phase dreht, sondern auch noch in der Intensität schwächt. Das Phasenplättchen wird deshalb mit einer absorbierenden Schicht versehen, die für positiven Phasenkontrast eine relative Durchlässigkeit von 25 bis 35% hat. Beim negativen Phasenkontrast wird die relative Durchlässigkeit meist noch etwas geringer gewählt, z.T. bis unter 10%. Solche Spezialobjektive haben bei der Fa. Reichert, Wien, einen eigenen Namen erhalten, Objektive für Anoptralkontrast.
Mit abnehmender relativer Durchlässigkeit nähert sich der Bildcharakter immer mehr dem des Dunkelfelds. Ist das Phasenplättchen undurch-


a)


b)


c)


d)


a)

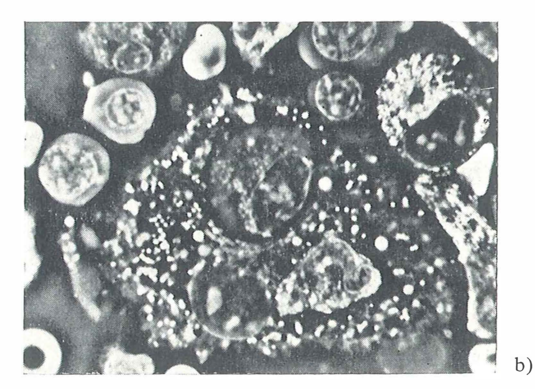

b)

Bild 6.13. Retikulumzelle aus dem Knochenmark

a) positiver;
b) negativer Phasenkontrast (Rind in [64])

lässig, dann gelangt nur noch das gebeugte Licht in die Zwischenbildebene, und es liegt reines Dunkelfeld vor. Zum Unterschied der vorher beschriebenen Dunkelfeldanordnung gelangt auch das direkte Licht ins Objektiv und wird erst in der Objektivbrennebene zurückgehalten. Es wird im Gegensatz zum allseitig schrägen Dunkelfeld als zentrales Dunkelfeld bezeichnet. Der Vorteil des zentralen Dunkelfelds besteht darin, daß von jedem Beleuchtungsbündel nach allen Seiten abgebeugtes Licht zur Bildentstehung beiträgt. Dem steht der Nachteil des an den Linsenflächen des Objektivs entstehenden Streulichts gegenüber, was zu einer geringen Aufhellung des Untergrunds führt.

In den Bildern 6.12a bis d wird die gleiche Gruppe von Phasenstreifen im Hellfeld, im positiven und

Bild 6.12. Phasenstreifen

a) im Hellfeld;
b) im positiven;
c) im negativen Phasenkontrast;
d) im zentralen Dunkelfeld

negativen Phasenkontrast sowie im zentralen Dunkelfeld und in den Bildern 6.13a und b eine Retikulumzelle im positiven und negativen Phasenkontrast gezeigt.

6.1.2.2. Intensität und Kontrast bei Phasenkontrast und Dunkelfeld

Man muß dabei einige der bisher gemachten Einschränkungen fallenlassen. Die Gleichungen für die Bildintensität und den Kontrast sollen für jede beliebige relative Phasendrehung von Objekt und Phasenplättchen gelten, d.h. auch für gemischte Objekte, die sowohl das Licht schwächen als auch in der Phase verändern, und auch für Dunkelfeld.
Die relative Phasendrehung und Durchlässigkeit des Objekts sind φ und p^2 und die des Phasenplättchens ψ und t^2. Dann erhält man die im Bild 6.14 gezeigte Vektordarstellung für Objekt und Bild.

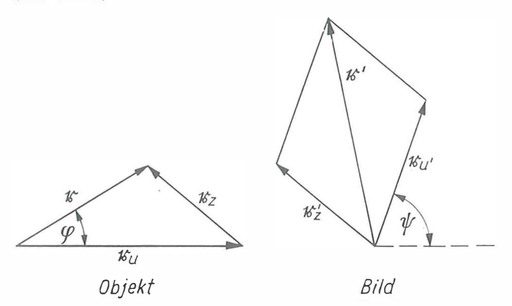


Bild 6.14. Vektordarstellung von Objekt und Bild für beliebige Phasendrehungen und Durchlässigkeiten von Objekt und Phasenplättchen

Mit $\mathfrak{r}' = \mathfrak{r}'_u + \mathfrak{r}'_z = \mathfrak{r}'_u + \mathfrak{r} - \mathfrak{r}_u$ und $\mathfrak{r}'_z = \mathfrak{r}_z$ ergibt sich durch Bildung der skalaren Produkte für die Bildintensität

$$\mathfrak{r}'^2 = \mathfrak{r}'\mathfrak{r}' = \mathfrak{r}'^2_u + \mathfrak{r}^2 + \mathfrak{r}^2_u + 2(\mathfrak{r}'_u\mathfrak{r} - \mathfrak{r}'_u\mathfrak{r}_u - \mathfrak{r}\mathfrak{r}_u). \qquad (6.1)$$

Setzt man $|\mathfrak{r}_u| = 1$; $|\mathfrak{r}| = p$; $|\mathfrak{r}'_u| = t$ und $|\mathfrak{r}'| = r$ die resultierende Amplitude, dann ist die resultierende Intensität

$$I_{\text{Obj}} = r^2 = 1 + p^2 + t^2 - 2p\cos\varphi + 2t\,[p\cos(\psi - \varphi) - \cos\psi]. \qquad (6.2\text{a})$$

$|\mathfrak{r}_u| = 1$ besagt, daß die einfallende Intensität willkürlich gleich 1 gesetzt wird. Für den Fall des positiven Phasenkontrastes ($\psi = -90°$) erhält man aus Gl. (6.2a)

$$I_{\text{Obj}} = 1 + p^2 + t^2 - 2p(\cos\varphi + t\sin\varphi) \qquad (6.2\text{b})$$

und für ein reines Phasenobjekt ($p = 1$) sehr kleiner Phasendrehung

$$I_{\text{Obj}} \approx t^2 + \varphi(\varphi - 2t). \qquad (6.2\text{c})$$

Die Intensität der Umgebung beträgt in allen drei Fällen

$$I_{\text{Umg}} = t^2.$$

Im Dunkelfeld ist $t = 0$, so daß man statt Gln. (6.2a) und (6.2b) erhält

$$I_{\text{Obj}} = 1 + p^2 - 2p\cos\varphi \qquad (6.2\text{d})$$

und statt Gl. (6.2c)

$$I_{\text{Obj}} \approx \varphi^2. \qquad (6.2\text{e})$$

Die Umfeldintensität ist im Dunkelfeld immer Null. Für den Kontrast definieren wir

$$K = \frac{I_{\text{Obj}} - I_{\text{Umg}}}{I_{\text{Obj}} + I_{\text{Umg}}}. \qquad (6.3)$$

Der Kontrast kann von -1 ($I_{\text{Obj}} = 0$; $I_{\text{Umg}} \neq 0$) bis $+1$ ($I_{\text{Obj}} \neq 0$; $I_{\text{Umg}} = 0$) variieren und ist im Bild 6.15 für ein reines Phasenobjekt ($p = 1$ sowie $t^2 = 0{,}25$ und $0{,}10$) und für positiven und negativen Phasenkontrast in Abhängigkeit von φ dargestellt. Maximaler Kontrast ist für $\tan\varphi = t$ und $t = 0$ zu erwarten, also für $\varphi = 26°\,30'$ und $206°\,30'$ bei $t^2 = 0{,}25$ bzw. $\varphi = 17°\,30'$ und $197°\,30'$ bei $t^2 = 0{,}10$. Der Fall des zentralen Dunkelfelds ist $t = 0$. Mit $t^2 = 0{,}10$ fällt K fast bis auf -1 ab, d.h., das Phasenobjekt erscheint fast schwarz auf hellem Grund.
Aus dem Bildkontrast im Bild 6.15 läßt sich noch nicht eindeutig auf das Vorzeichen der Objektphasendrehung schließen, da für $t^2 = 0{,}25$ bei $\varphi = 53°$ und für $t^2 = 0{,}10$ bei $\varphi = 35°$ eine Umkehr des Kontrastes eintritt. Diese Erscheinung wird auch als Inversion bezeichnet. Nur für kleine Objektphasendrehungen bis zu einem Grenzwinkel φ_G kann man beim positiven Phasenkontrast aus dem Vorzeichen des Bildkontrastes auf das Vorzeichen der Objektphasendrehung schließen. Die überwiegende Mehrzahl der in der Biologie interessierenden Objekte ist positiv und erscheint deshalb nur in dem φ-Bereich von 0 bis φ_G dunkler, von φ_G bis 360° heller als die Umgebung, im letzten Fall also wie ein negatives Phasenobjekt mit kleiner Phasendrehung. Mit kleinerer Durchlässigkeit des Phasenplättchens steigt zwar der Kontrast für Phasenobjekte kleiner Phasendrehung, gleichzeitig wird aber bei positivem Phasenkontrast der im Bild 6.15 gezeigte inversionsfreie Bereich eingeengt. Es können hierdurch u.U. Schwierigkeiten in der

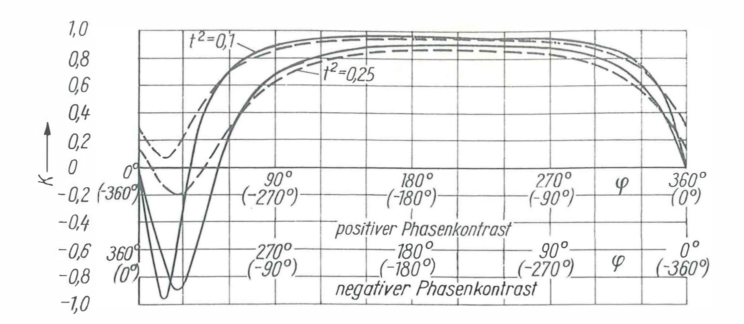


Bild 6.15
Kontrastfunktion für reine Phasenobjekte in Abhängigkeit von der Objektphasendrehung

Deutung der Phasenkontrastbilder auftreten. Wendet man dagegen den negativen Phasenkontrast an, dann erscheinen die positiven Objekte über einen φ-Bereich von 0 bis $(360° - \varphi_G)$ hell auf dunklem Grund, also ohne Inversion. Der die kleinen Phasendrehungen einschließende inversionsfreie Bereich wird in diesem Fall um so größer, je kleiner die Durchlässigkeit des Phasenplättchens ist. Man sollte jedoch mit dieser Durchlässigkeit nicht zu weit heruntergehen. Denn erstens erhöht sich bei einer Schwächung des direkten Lichts in gleicher Weise der relative Anteil des parasitären Streulichts. Zweitens gehen hierdurch Information und Intensität verloren; denn mit abnehmender Durchlässigkeit des Phasenplättchens nähert man sich immer mehr dem Dunkelfeld mit den schon erwähnten Nachteilen.

Ein gemischtes Objekt, das sowohl die Phase als auch die Amplitude des hindurchgehenden Lichts ändert und im Hellfeld gut sichtbar ist, kann im Phasenkontrast verschwinden. Das ist der Fall, wenn der Zähler der Gl. (6.3) Null wird, und hat sehr wichtige praktische Konsequenzen. Man kann im Phasenkontrast nicht in jedem Fall (besonders bei solchen gemischten Objekten) Kontrastverstärkung erwarten, sondern muß u. U. auch eine Kontrastminderung in Kauf nehmen.

6.1.2.3.
Nichtstrenges Zernike-Verfahren

Bisher wurde eine sehr kleine Aperturblende und damit ein so kleines Phasenplättchen vorausgesetzt, daß die Beeinflussung des am Objekt gebeugten Lichts durch das Phasenplättchen zu vernachlässigen ist. Ob diese Voraussetzung erfüllt ist, hängt bei kleinem, aber endlich ausgedehntem Phasenplättchen auch noch von der Größe des Objekts ab. Eine genauere Untersuchung zeigt, daß diese Voraussetzung in Strenge nicht erfüllt werden kann und daß bei Nichterfüllung Strukturen im Bild erscheinen, die im Objekt nicht vorhanden sind [62] [64]. Jedem Praktiker sind die Haloerscheinungen bekannt, d.h. die hellen Höfe, die sich um dunkel erscheinende Objekte legen. Der wesentliche Grund dafür liegt darin, daß man einerseits aus Intensitätsgründen und andererseits aus Gründen der Bildqualität die Aperturblende nicht zu klein machen darf. Da das Phasenplättchen das Bild der Aperturblende vollständig überdecken muß, wird stets auch ein Teil des am Objekt gebeugten Lichts vom Phasenplättchen mit beeinflußt. Der relative Anteil ist um so größer, je größer das Objekt ist, und hängt außerdem von der Gestalt der Aperturblende und der des Phasenplättchens ab. Es ist schon frühzeitig erkannt worden, daß in dieser Hinsicht die Ringblende die günstigsten Bedingungen liefert, weil sie rotationssymmetrisch ist und, gegenüber einer Kreisblende von gleicher Fläche, einen wesentlich geringeren Teil des am Objekt gebeugten Lichts beeinflußt. Aus diesen Gründen werden die Phasenkontrasteinrichtungen heute fast ausschließlich mit ringförmigen Phasenplättchen geliefert.

Eine genauere mathematische Begründung der von der unvollständigen Trennung des gebeugten und direkten Lichts verursachten Bildverfälschungen wird u.a. in [62] [64] [94] [105] [118] gegeben. Hier sei lediglich das wesentliche Ergebnis dieser Untersuchungen (Bild 6.16) für ein kreisförmiges Phasenobjekt vom Radius B und mit der relativen Phasendrehung $\varphi = 25°$ dargestellt. ϱ ist der Abstand vom Bildmittelpunkt in Einheiten des Bildradius B''. Als Parameterwert ist

$$\Gamma = \frac{Bk}{f'_{\mathrm{Obj}}} \Delta R$$

gewählt worden.

B	Radius des kreisförmigen Objekts,
$k = 2\pi/\lambda$	Wellenzahl,
f'_{Obj}	Objektivbrennweite,
ΔR	Breite des Phasenrings.

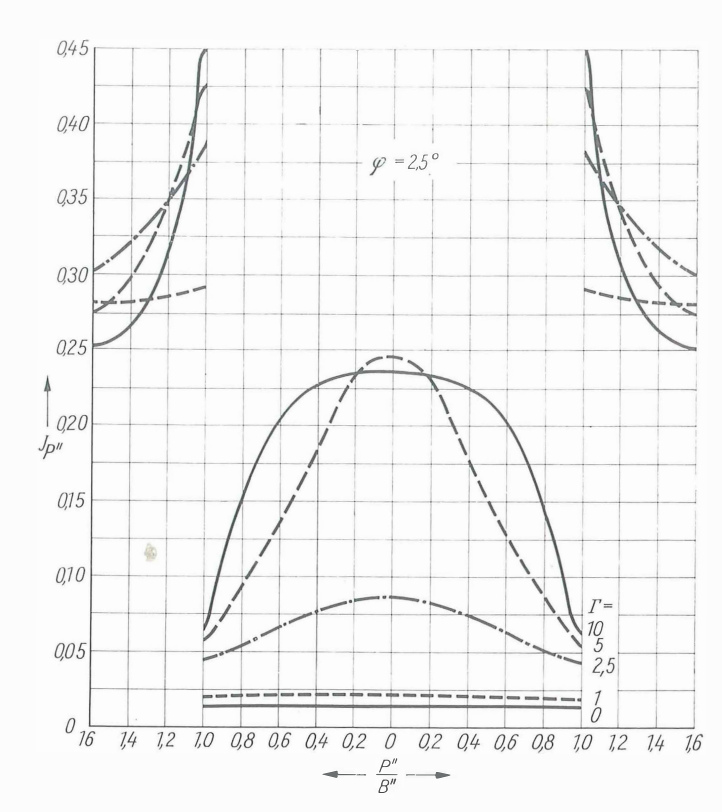
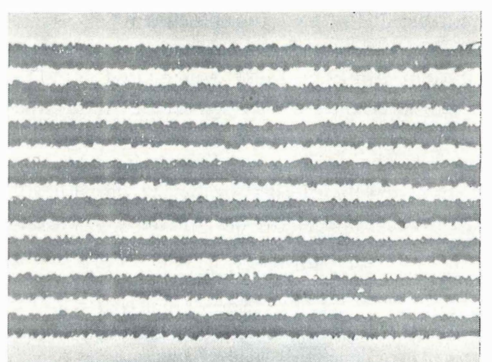


Bild 6.16
Berechnete Bildfunktion für ein reines Phasenobjekt mit einer relativen Phasendrehung von $\varphi = 25°$ im positiven Phasenkontrast ($t^2 = 0{,}25$ $\psi = -90°$); Parameterwert ist $\Gamma = (Bk/f'_{\text{Obj}})\,\Delta R$



Dem Bild 6.16 ist zu entnehmen, daß der Grad der Bildverfälschung von dem Γ-Wert und damit wesentlich von dem Produkt $(B\Delta R)$ abhängt, da k/f'_{Obj} als Konstante anzusehen ist. Diese Darstellung führt zu dem wichtigen Ergebnis, daß bis zu einem Wert $\Gamma = 1$ keine merkliche Bildverfälschung zu erwarten ist. Bezeichnet man als objektgetreue Abbildung eine solche, bei der gleiche relative Phasendrehungen in gleichen relativen Helligkeitswerten dargestellt werden, dann lautet die Bedingung für die Objekttreue

a) $$\Gamma = \frac{k}{f'_{\text{Obj}}} B\Delta R \leqq 1. \qquad (6.4)$$

Für Γ-Werte bis zu 2,5 ist die Bildverfälschung noch relativ gering. Für größere Γ-Werte tritt ein heller Hof um ein dunkles Phasenobjekt auf und eine Aufhellung im Innern desselben. Je größer der Γ-Wert ist, um so mehr zieht sich der helle Hof auf eine schmale Randzone um das Objekt zusammen, und um so mehr dehnt sich die Aufhellung im Innern des Objekts zum Rande hin aus.

b)

Bild 6.17
a) und b) Phasenstreifen von Bild 6.12, unter Verwendung zweier Phasenringe unterschiedlicher Breite aufgenommen

An den zugehörigen berechneten Bildfunktionen im Bild 6.16 und den Vergleichsaufnahmen in den Bildern 6.17a und b, die die gleichen Phasenstreifen wie in den Bildern 6.12a bis c, jedoch nur im positiven Phasenkontrast unter Verwendung zweier Phasenringe unterschiedlicher Breite zeigen, ist das sehr deutlich zu sehen.

Mit der unerwünschten Bildverfälschung sind auch Vorteile verbunden. Durch den Haloeffekt tritt eine Kontrastüberhöhung am Objektrand ein, wodurch dieser schärfer erscheint. Die Aufhellung im Innern eines größeren Objekts gibt diesen Raum für zarte innere Phasenstrukturen frei, die sonst durch den Kontrast des Objekts als Ganzes überdeckt würden.

6.1.2.4. Farbiger Phasenkontrast [63] [64]

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde stets Beleuchtung mit monochromatischem Licht vorausgesetzt, so daß nur Helligkeitskontraste entstehen konnten. Jetzt soll das Licht des gesamten sichtbaren Spektrums zur Abbildung verwendet werden. Dann sind auch bei farblosen Objekten und farblosem Einbettungsmittel Farbkontraste im Phasenkontrastbild möglich, da die Objekt und Phasenplättchen charakterisierenden Größen p, t, φ, ψ von der Lichtwellenlänge, also von der Farbe, abhängen. Die relativen spektralen Durchlässigkeiten von Objekt und Phasenplättchen sind $p^2 = p^2(\lambda)$ und $t^2 = t^2(\lambda)$. Bei farblosen Objekten und farblosem Phasenplättchen sind diese natürlich für alle Farben gleich. Aus der Dicke d und Brechzahldifferenz Δn ergeben sich φ und ψ zu

$$\varphi = \frac{d_{\mathrm{Obj}}}{\lambda} \Delta n_{\mathrm{Obj}} 2\pi; \quad \psi = \frac{d_{\mathrm{Ph}}}{\lambda} \Delta n_{\mathrm{Ph}} 2\pi; \quad (6{,}5\,\mathrm{a,\ b})$$

Δn_{Obj} Brechzahldifferenz zwischen Objekt und Umgebung,

Δn_{Ph} Brechzahldifferenz zwischen dem der Aperturblende konjugierten und komplementären Bereich des Phasenplättchens.

Unter der vereinfachenden Annahme, daß Δn_{Obj} und Δn_{Ph} konstant sind (Vernachlässigung der Dispersionsunterschiede), lassen sich die Phasendrehungen φ und ψ in der vereinfachten Form

$$\varphi = \varphi_0 \frac{\lambda_0}{\lambda}; \quad \psi = \psi_0 \frac{\lambda_0}{\lambda}$$

schreiben, wobei φ_0 und ψ_0 die zu λ_0 gehörigen Phasendrehungen sind. φ und ψ sind also zur Wellenlänge umgekehrt proportional. Obige Ausdrücke für φ und ψ in Gl. (6.2a) eingesetzt, ergibt die wellenlängenabhängige Intensität im Phasenkontrastbild des strengen Zernike-Verfahrens.

$$I(\lambda) = r^2(\lambda) = 1 + p^2 + t^2 - 2p\cos\left(\varphi_0 \frac{\lambda_0}{\lambda}\right) + 2t\left[p\cos(\psi_0 - \varphi_0)\frac{\lambda_0}{\lambda} - \cos\psi \frac{\lambda_0}{\lambda}\right]. \quad (6.6)$$

Um bei relativ kleinen Phasendrehungen möglichst starke Farbkontraste zu erzielen, benutzt man zweckmäßig eine stärkere relative Phasendrehung des Phasenplättchens, z.B. $\psi_0 = 360°$ und mehr.

Eine weitere Verstärkung des Farbkontrasts wird durch geeignete Wahl des Einbettungsmittels mit stark wellenlängenabhängigem Δn_{Obj} erreicht. Darauf wird bei der Farbimmersionsmethode noch genauer eingegangen.

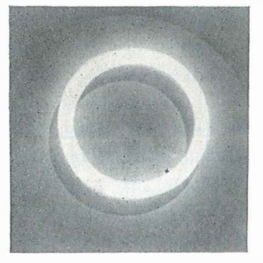
6.1.2.5. Phasenkontrasteinrichtungen

Die wesentlichen Bestandteile, die ein Hellfeldmikroskop zu einem Phasenkontrastmikroskop machen, sind die kleine Aperturblende in der Nähe der Kondensorbrennebene und das dazu konjugierte Phasenplättchen in der Objektivbrennebene oder einem Bild derselben. Die Aperturblende hat die Aufgabe, einen Teilbereich der Objektivapertur festzulegen, der im wesentlichen dem direkten Licht zugeordnet ist. Der dazu komplementäre Bereich steht dann ausschließlich dem am Objekt gebeugten Licht zur Verfügung. Das direkte Licht passiert den Bereich der Objektivaustrittspupille, wo das Bild der ringförmigen Aperturblende entsteht, während das am mikroskopischen Objekt gebeugte Licht, je nach Feinheit der Objektstrukturen, einen variablen Bereich der Objektivaustrittspupille ausfüllt. Der optimale Durchmesser der Ringblende $d_{\mathrm{RB}l}$ und damit des Phasenrings d_{Ph} hängt vom Durchmesser d_{AP} der Objektivaustrittspupille ab. d_{Ph} wählt man zweckmäßig $\frac{1}{2}$ bis $\frac{2}{3}$ von d_{AP}. Zwischen $d_{\mathrm{RB}l}$ und d_{Ph} besteht die Beziehung

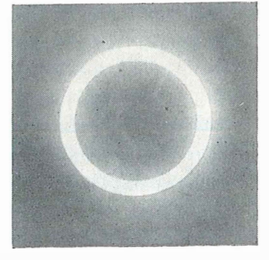
$$d_{\mathrm{RB}l} = d_{\mathrm{Ph}} \frac{f_{\mathrm{Kond}}}{f_{\mathrm{Obj}}}. \quad (6.7)$$

Die Breite des Phasenrings soll im Normalfall etwa $\frac{1}{15}$ des Pupillendurchmessers betragen.

Nach Gl. (6.7) ist bei gleichem Durchmesser des Phasenrings der Ringblendendurchmesser der Kondensorbrennweite direkt und der Objektivbrennweite umgekehrt und damit dem Abbildungsmaßstab direkt proportional. Für Routine- und Forschungsarbeiten ist es kaum zumutbar, bei Ob-



a) dezentriert

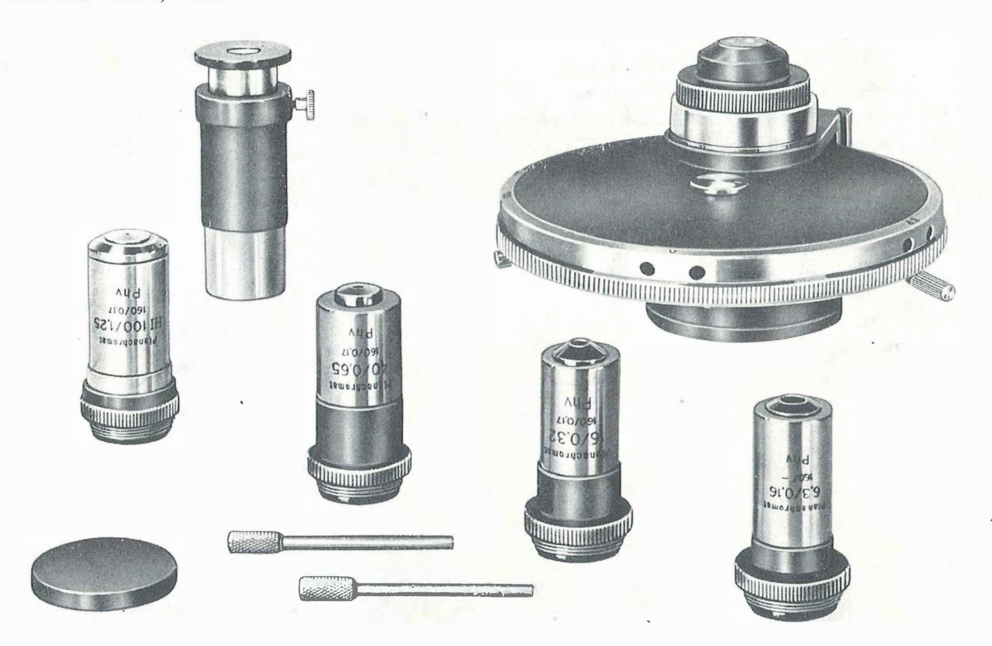


b) zentriert

Bild 6.18. Ringblendenzentrierung

jektivwechsel auch den Kondensor zu wechseln. Dann ist aber ein Wechsel der Ringblenden erforderlich. Das wird mit einem Ringblendenrevolver ausgeführt, der sich in der Nähe der Kondensorbrennebene befindet. Der Phasenring ist meist innerhalb des Objektivs in einer Kittfläche des optischen Systems angeordnet. Die Größen der Ringblenden und Phasenringe sind so aufeinander abgestimmt, daß das jeweilige Bild der Ringblende vom zugehörigen Phasenring vollständig überdeckt wird. Bei stark strukturierten Präparaten ist das Ringblendenbild, wie im Bild 6.18 dargestellt, von einem hellen Saum umgeben, der von dem an den Objektstrukturen gebeugten Licht herrührt. Da es auf genaue Überdeckung von Ringblendenbild und Phasenring ankommt, muß eine Zentriermöglichkeit der Ringblenden vorgesehen werden, um die unvermeidlichen geringen Fertigungstoleranzen von Kondensor und Objektiv und die durch ein keilförmiges Präparat hervorgerufene Dezentrierung des Ringblendenbilds auszugleichen. Zu diesem Zweck sind Kondensoren entwickelt worden (Bild 6.19), die an die Stative ansetzbar sind und die zentrierbaren Ringblenden tragen. Zur Erleichterung der Justierung wird entweder das Okular durch ein Hilfsmikroskop ersetzt oder bei größeren Stativen eine Bertrand-Linse in den Abbildungsstrahlengang eingeschaltet, die die hintere Objektivbrennebene in die Zwischenbildebene abbildet. Im Bild 6.20 wird das ERGAVAL phako der MIKROVAL-Reihe des VEB Carl Zeiss JENA mit aplanatischem Phasenkondensor gezeigt. Die Notwendigkeit verschieden großer Ringblenden entfällt, wenn man statt des aplanatischen Phasenkondensors den im Abschn. 2.7. beschriebenen pankratischen Kondensor verwendet. Das dem eigentlichen aplanatischen Kondensor vorgeschaltete pankratische System erlaubt es, eine feste Ringblende in variabler Größe in die vordere Kondensorbrennebene abzubilden und so das Ringblendenbild der Größe

Bild 6.19. Phasenkontrasteinrichtung mit aplanatischem Phasenkondensor für das Stativ ERGAVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



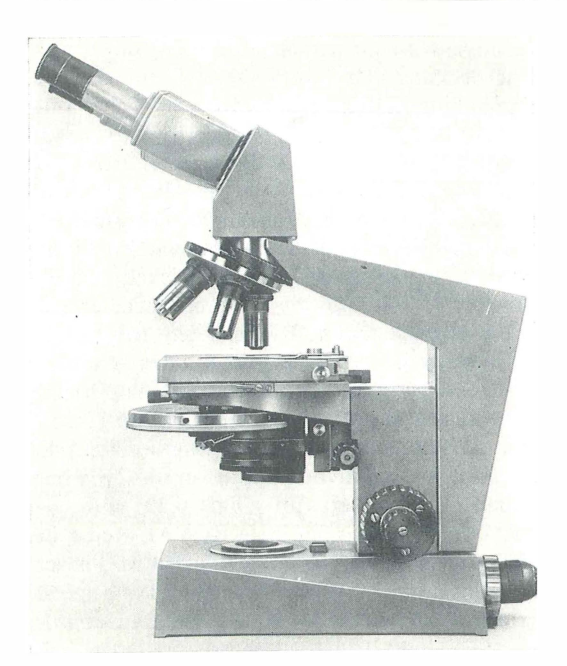


Bild 6.20. ERGAVAL phako mit aplanatischem Phasenkondensor

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

des im Objektiv befindlichen Phasenrings anzupassen.

Die zur Erzielung maximalen Kontrastes erforderliche Durchlässigkeit t^2 und relative Phasendrehung ψ des Phasenplättchens hängen sowohl von der relativen Durchlässigkeit p^2 als auch von der relativen Phasendrehung φ des Objekts ab.

In der Praxis der Phasenkontrastmikroskopie interessieren aber vorwiegend solche Objekte, deren Phasendrehung klein ist ($\varphi \ll 45°$) und deren relative Durchlässigkeit p^2 nahe bei 1 liegt. Damit ergibt sich

für positive φ
als günstigste Phasendrehung $\psi \approx -90°$
und für negative φ $\psi \approx +90°$.

In der Praxis hat es sich gezeigt, daß in speziellen Fällen der negative Phasenkontrast einen schnelleren Überblick über feine Objekteinzelheiten ermöglicht, so daß es heute in Sonderfällen zweckmäßig erscheint, neben dem positiven auch den negativen Phasenkontrast zu verwenden. Im letzteren Fall können auch Phasenplättchen mit geringerer relativer Durchlässigkeit (< 10%) zweckmäßig sein. Da in der Phasenkontrastmikroskopie vorwiegend mit starken Objektiven gearbeitet wird, sind dafür Spezialobjektive erforderlich, wenn nicht ein gut korrigiertes Zwischenabbildungssystem (Bild 6.21) vorhanden ist. Ein solches ist kostenintensiv und deshalb für die kleineren Mikroskoptypen kommerziell nicht zu vertreten. Vorschläge für eine solche Anordnung sind genügend vorhanden, doch Verkaufsgeräte dieser Art sind zunächst kaum bekannt geworden. Erst in letzter Zeit wurde vom VEB Carl Zeiss JENA, in Verbindung mit dem PERAVAL interphako (s. Abschn. 6.1.3.), eine solche Einrichtung für universellen Phasenkontrast entwickelt, dessen optisches Prinzipschema im Bild 6.21 dargestellt ist. Auf Einzelheiten des optischen Aufbaus wird im Abschn. 6.1.3. genauer eingegangen.

Zunächst erfolgt, wie bei jeder anderen Phasenkontrastanordnung, über Kondensor *2* und Objektiv *4* die Abbildung der Ringblende *1* in die Objektivbrennebene *1'*. Der erste Teil des Zwischenabbildungssystems *5* erzeugt ein erstes Zwischenbild *3'* und zusammen mit dem zweiten Teil *6* ein zweites Bild *1''* der Ringblende *1*. Ein nicht dargestelltes Fokussierglied im Zwischenabbildungssystem ermöglicht es, für alle verwendeten Objektive das zweite Ringblendenbild *1''* exakt in die gleiche Ebene zu legen, in der sich das Phasenplättchen *7* befindet. Mit einer dahinter angeordneten ein- und ausschaltbaren Bertrand-Linse *8* kann nacheinander, ohne Okularwechsel, auf das Phasenplättchen *7* mit dem Ringblendenbild *1''* oder auf das vom zweiten Teil des Zwischenabbildungssystems erzeugte zweite Zwischenbild *3''* fokussiert werden. Da sich die Pupillengrößen der verschiedenen Objektive nicht

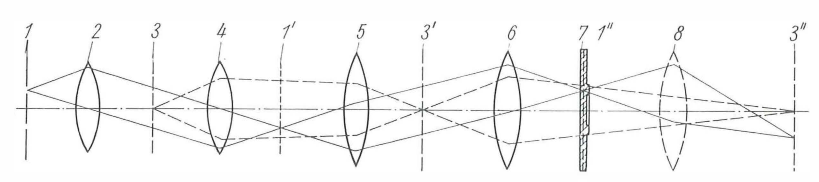
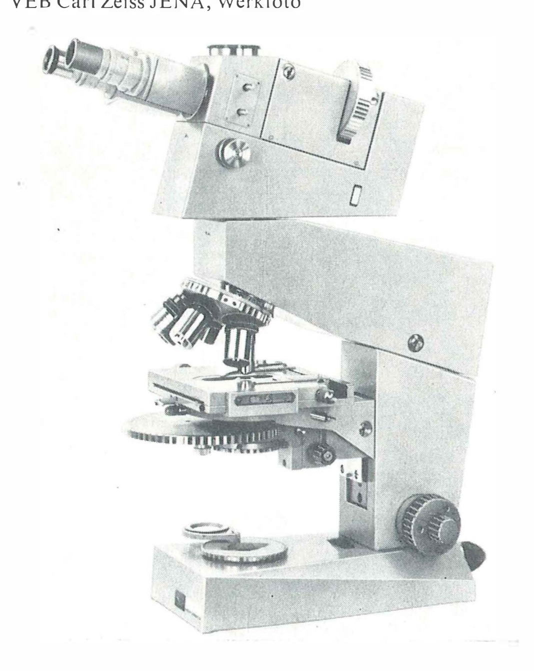


Bild 6.21. Phasenkontrastanordnung mit Zwischenabbildung

1 Ringblende; *1'* 1. Bild; *1''* 2. Bild der Ringblende; *2* Kondensor; *3* Objektebene; *3'* und *3''* erstes und zweites Zw.-Bild; *4* Objektiv; *5* 1. Linse des Zw.-Abb.-Systems; *6* 2. Linse des Zw.-Abb.-Systems; *7* Phasenplättchen; *8* Bertrand-Linse

sehr stark unterscheiden, kommt man mit zwei Phasenplättchen unterschiedlicher Größe aus; eines für die Trockenobjektive und das andere für die Ölimmersion.
Verwendet werden auf zwei ansetzbaren Revolvern befindliche Phasenkontrastplättchen für positiven, negativen und farbigen Phasenkontrast sowie für zentrales Dunkelfeld.
Die Bezeichnung „universeller Phasenkontrast" besagt, daß im Prinzip keine Beschränkungen hinsichtlich Wahl der Objektive und Kontrastplättchen vorhanden sind. Es können Hellfeldobjektive jeden Typs verwendet werden, wenn nur der Abbildungsmaßstab auf die Größe der Ringblenden abgestimmt ist.
Im Bild 6.22 wird das Mikroskop PERAVAL interphako für universellen Phasenkontrast gezeigt. Zur Beleuchtung wird ein speziell für die Interphakoeinrichtung berechneter aplanatisch-achromatischer Kondensor der Apertur 0,8 verwendet, in den verschiedene Blendensysteme eingesetzt werden können. Bei Phasenkontrast ist das eine Revolverscheibe mit vier Ringblenden unterschiedlicher Größe für den vorgesehenen Objektivsatz, die denen der Phasenkontrasteinrichtung Phv mit aplanatischem Phasenkondensor entsprechen. Auf das Grundstativ des PERAVAL wird der Grundkörper mit dem

Bild 6.22. PERAVAL interphako für universellen Phasenkontrast
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



Zwischenabbildungssystem aufgesetzt, das den Einsatz Ph mit den Phasenplättchen trägt. Zur Beobachtung der Pupille kann eine fokussierbare Bertrand-Linse eingeschaltet werden.

6.1.2.6. Anwendungen in Biologie und Medizin

Das Hauptanwendungsgebiet des Phasenkontrastverfahrens liegt in der Biologie und Medizin. Hier hat es seine größten Erfolge bei der Untersuchung lebender und überlebender mikroskopischer Objekte erzielt und in vielen Fällen diese Untersuchung erst ermöglicht. Dazu gehört in erster Linie die fortlaufende Beobachtung bzw. Kinematografie der sich entwickelnden Bakterien-, Pilz- und Hefekulturen und ihre Beeinflussung durch Reagenzien oder Antibiotika oder die Morphologie und Entwicklung des gesunden und des kranken Blutes. Doch auch bei der Untersuchung fixierter histologischer Schnitte sowie von Sekreten, Exkreten und Exsudaten bietet die Phasenkontrastbeobachtung ungefärbter Präparate in vielen Fällen wesentliche Vorteile gegenüber der Hellfeldbeobachtung gefärbten Materials. Die Dunkelfeldmethode wird hingegen nur noch in Spezialfällen angewendet. Bei der Phasenkontrastbeobachtung, besonders wenn die Brechzahldifferenz zwischen Objekt und Umgebung relativ groß ist, treten die bekannten Haloeffekte auf, die vor allem bei eng benachbarten Objekten sehr störend sein können.
Barer [59] beschreibt eine Methode, wie man durch geeignete Wahl des Einbettungsmittels im Phasenkontrast die Brechzahl des Zellinhalts bestimmen und gleichzeitig den störenden Haloeffekt beseitigen kann, so daß die Einzelheiten des Zellinhalts deutlich sichtbar werden, sofern sich die Brechzahl des Zytoplasmas von der des Zellinhalts unterscheidet.
In der Mineralogie ist diese Methode der Brechzahlbestimmung schon vorher angewendet und in letzter Zeit noch weiter ausgebaut worden. Sie beruht auf der Angleichung der Brechzahlen von Objekt und Einbettungsmittel, d.h. auf Verschwinden der Kontrastwirkung. Die bei Phasenkontrast entstehenden unerwünschten Randeffekte sind dafür ein gutes Kriterium. Diese Immersionsmethode liefert deshalb bei Anwendung des Phasenkontrastverfahrens als Nullmethode bei der Brechzahlbestimmung eine 10mal höhere Genauigkeit, als mit den vorher üblichen Mitteln möglich war. Allerdings sind die in der Mineralogie verwendeten Einbettungsmittel zum großen Teil in der Biologie nicht brauchbar, da sie die

Zellen schädigen. Das Einbettungsmittel muß außerdem osmotisch neutral sein, weil die Zellen sonst quellen oder schrumpfen und damit ihre Brechzahl ändern. Als am geeignetsten hat sich bovin plasma albumin gezeigt. Brechzahlangleichung wird durch unterschiedliche Proteinkonzentration nach der Gleichung

$$n = n_S + \alpha C$$

erreicht (Erläuterungen zu dieser Gleichung folgen im Abschn. 6.1.3.4.).

Müller [96] wendete diese Methode der Brechzahlangleichung zur Verbesserung der Phasenkontrastabbildung lebender Hefen an. Hefezellen sind ohne besondere Präparierung wegen ihrer Linsenwirkung und der hierdurch hervorgerufenen besonders starken Haloerscheinungen für die Phasenkontrastbeobachtung denkbar ungeeignet. Bei Verwendung von Gelatine-Gelen als Einschlußmittel konnte durch Brechzahlangleichung, ohne Störung des Lebensablaufs, die Linsenwirkung praktisch beseitigt und die Innenstruktur der Zelle deutlich sichtbar gemacht werden. Besonders wichtig ist diese Methode bei der Beobachtung zusammenhängender und sprossender Zellen. Durch Brechzahl- und Trübungsmessungen wird gezeigt, daß Gelatine-Gele in optischer Hinsicht einer Agar-Nährlösung deutlich über-

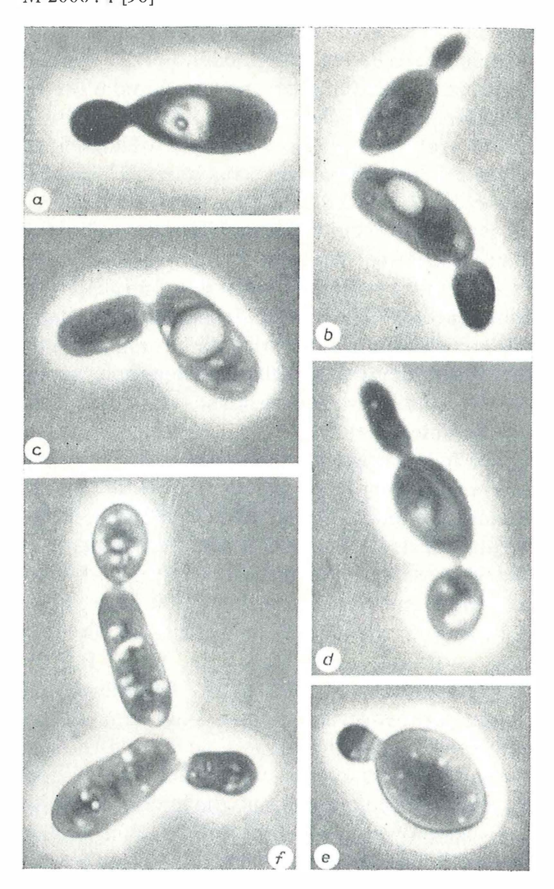


Bild 6.23. Hefezellen aus ein und derselben Kultur

a) und b) in einem Tropfen Nährlösung;
c) und d) in filtriertem nativem Hühnereiweiß;
e) und f) in normalprozentigem Agar im positiven Phasenkontrast
Die Brechzahlen sind nicht abgeglichen, und die Zellen erscheinen relativ dunkel mit einem hellen Hof. Feine Strukturen sind in den Zellen kaum wahrnehmbar.
M 2000 : 1 [96]

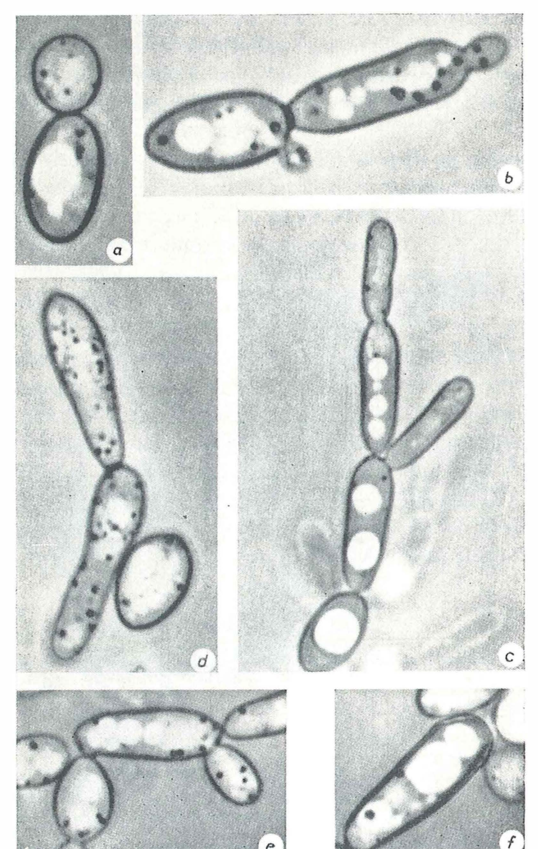


Bild 6.24. Hefezellen im positiven Phasenkontrast

mit Ausnahme von c), d), f) aus der gleichen Kultur wie im Bild 6.23, aber auf 30 %iger Gelatine. Die Brechzahlen sind abgeglichen, die Zellen aufgehellt und die Halos fast verschwunden. Feine Strukturen im Innern der Zellen, auch an den Verbindungsstellen junger Sproßzellen, sind deutlich sichtbar.
M 2000 : 1 für a) und b); M 1500 : 1 für c) bis f) [96]

legen sind, was anhand einiger Phasenkontrastaufnahmen lebender Hefezellen auch in den Bildern 6.23a bis f und 6.24a bis f demonstriert werden kann.
Die erste Arbeit über die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Biologie ist 1941 von *Köhler* und *Loos* [91] veröffentlicht worden. Besonderen Auftrieb hat die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Biologie durch die von *Michel* [95] 1943 im Zeitrafferfilm dargestellte Reifeteilung bei der Spermatogenese der Schnarrheuschrecke Psophus stridulus L. erhalten. *Michel* ist es erstmalig gelungen, die Reifeteilung von der Metaphase über die verschiedenen Phasen bis zur Entstehung der Tochterzelle im Bild lückenlos darzustellen.
Knöll [90] hat es in seiner Veröffentlichung über die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Bakteriologie unternommen, mit dieser neuen Untersuchungsmethode tiefere Einblicke in den Feinbau der lebenden und sich vermehrenden Bakterienzellen zu erhalten. Neben der laufenden Beobachtung der Entwicklung von Bakterienkolonien bietet das Phasenkontrastverfahren vor allem die Möglichkeit zu aufschlußreichen Vergleichen mit der im Hellfeld und Dunkelfeld beobachteten toten und präparierten Bakterienzelle. *Strugger* [111] hat im Jahre 1947 das Phasenkontrastverfahren erstmalig für zytologische Untersuchungen an Metaphytenzellen verwendet. Es ging dabei um die Frage, ob es in gleicher Weise wie am tierischen Objekt auch am pflanzlichen Material eine vorteilhafte Beobachtung der Kern- und Zellteilung ermöglicht. Diese Frage konnte eindeutig positiv beantwortet werden.
Buchsbaum [68] [69] untersucht den morphologischen Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf die lebende Zelle, um die in dieser Hinsicht günstigste Fixierungsmethode zu finden, und *von Hirsch* [86] [87] diskutiert die für Phasenkontrastbeobachtung histologischer Schnitte günstigste Einbettung, vor allem in Abhängigkeit von der Brechzahl des Einbettungsmittels.
Bajer [55] [56] und *Mole-Bajer* [57] beschäftigen sich ausführlich mit der kinematografischen Analyse der Mitose von Pflanzenzellen, besonders der Endospermmitose des Liliengewächses Haemanthus katharinae.
Von *Girbardt* [77] bis [80] sind eine Reihe von Untersuchungen an Pilzhyphen, speziell an denen des zur Klasse der Basidiomyceten gehörenden Polystictus versicolor (Trametes versicolor) durchgeführt worden. Dieser Pilz liefert besonders gute mikroskopische Untersuchungsbedingungen. Er läßt sich kultivieren und unmittelbar mikroskopisch beobachten auf Medien, deren Brechzahl der des Zellplasmas angeglichen ist, wodurch der Haloeffekt unterdrückt oder sehr stark gemindert wird und die Voraussetzungen für die Erreichung eines optimalen Kontrastes gegeben sind.
Einer der einschneidenden Prozesse im Zellgeschehen, die Zellteilung, findet bei Polystictus versicolor zu jeder Tageszeit und in jedem Präparat statt. Besonders für die Bearbeitung von Fragen der Kernteilung ist der Pilz daher prädestiniert. Außerdem kündigt die Zelle dem Untersucher Ort und Zeit der Kernteilung vorher durch einen charakteristischen Auswuchs an, der „Schnalle“ genannt wird (Bild 6.25a bis j).
Von besonderer Wichtigkeit für die Elektronenmikroskopie ist es, den Anschluß von der Struktur der lebenden zum elektronenmikroskopischen Bild der fixierten Zelle zu finden. Das ist in hervorragender Weise beim Polystictus versicolor gelungen.
Mit einer Zielschnittpräparation ist es möglich [80], das Substrukturbild eines vorgewählten Zellareals mit dem gleichen Areal der lebenden Zelle zu vergleichen (Bilder 6.26a und b). Dieser Vergleich zeigt eindeutig, daß das Phasenkontrastbild (Bild 6.26a) alle wesentlichen Zellelemente enthält, wie sie die Permanganatfixierung zeigt. Das bezieht sich sowohl auf größere Zellorganellen (Zellkern, Vakuolen und Mitochondrien) wie auch auf die membranösen Elemente des endoplasmatischen Retikulums und die Porenkappen an den Wänden.
Es sind jedoch verschiedentlich Bedenken erhoben worden, ob es sich bei den im Phasenkontrast sichtbaren Strukturen wirklich um das endoplasmatische Retikulum handelt, da die Membranen seiner Elemente wesentlich dünner sind, als es der Auflösungsgrenze des Mikroskops entspricht. Daraufhin hat es der Verfasser 1966 auf Anregung von *Girbardt* unternommen, anhand von dem Problem angepaßten Modellobjekten theoretisch abzuleiten, wo die Erkennbarkeitsgrenze für solche Zellelemente im Phasenkontrast liegt [65]. Danach besteht kein Grund, daran zu zweifeln, daß die im Phasenkontrast sichtbaren Zellelemente des endoplasmatischen Retikulums denen im elektronenmikroskopischen Bild entsprechen.
Weitere Phasenkontrastuntersuchungen zum Problem des endoplasmatischen Retikulums sind u.a. von *Fawcett* und *Ito* [73] an frisch isolierten

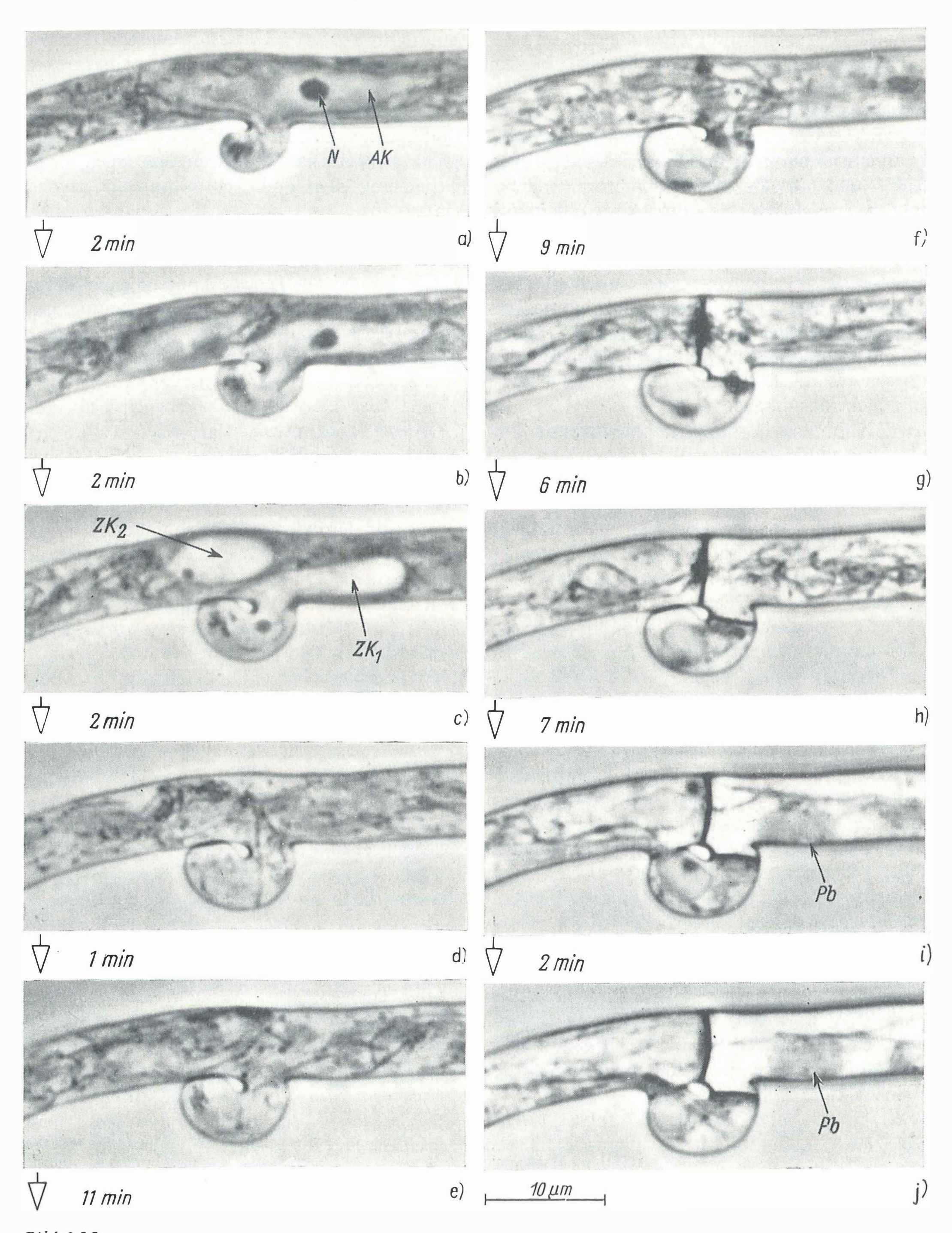


Bild 6.25

a) bis j) Die verschiedenen Phasen der Schnallenbildung bei Polystictus versicolor L. M 1300 : 1. Der Zeitabstand zwischen je zwei Aufnahmen ist angegeben [78]

Zellen des Keimepithels vom Meerschweinchen durchgeführt worden.

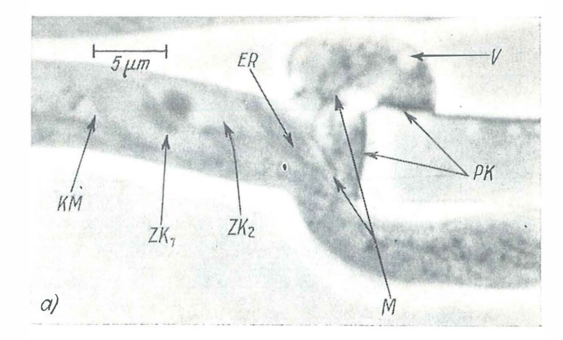
Das Hauptanwendungsgebiet des Phasenkontrastverfahrens in der Medizin liegt bei der Zellularpathologie und der pathologischen Histologie mit dem Ziel, aus der Morphologie und Verteilung der Einzelzellen sowie der Art der Zellgewebe eine Frühdiagnose zu ermöglichen bzw. die Diagnose zu erleichtern und zu beschleunigen. Besonders hervorgehoben seien in diesem Zusammenhang die Frühdiagnose des Krebses und die der verschiedenen Blutkrankheiten.

Zusammenfassende Darstellungen über die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Medizin sind von *Zinser* [125], *Hansen*, *Rominger* und *Michel* [82], *Fröhlich* [75] sowie *Siering* und *Aderhold* [107], außerdem ist ein kleineres Buch über Phasenkontrasthämatologie von *Franke* [74], ein umfangreicher Atlas der Phasenkontrasthämatologie von *Rind* und ein Atlas der Phasenkontrastmikroskopie in Anwendung auf die Gynäkologie von *Stoll* [110] erschienen. *Zinser* befaßt sich in seinem Buch „Zytodiagnostik in der Gynäkologie" mit der Entnahmetechnik, Färbetechnik, Zyklusdiagnostik und zytologischen Karzinomdiagnostik. Die gezielte Abschabung unter dem Kolposkop und die nachfolgende Betrachtung im phasenoptischen Bild werden als die günstigste Arbeitsweise angesehen.

Hansen, *Rominger* und *Michel* behandeln die allgemeine Untersuchungstechnik, Anwendungen in der Hämatologie, bei Organpunktaten und Geweben, in der pathologischen Histologie, bei Protozoen, Pilzen, Bakterien, Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen sowie Sekreten und Exsudaten. *Fröhlich* behandelt etwa die gleichen Anwendungsgebiete.

Siering [106] wendet seit 1949 das Phasenkontrastverfahren besonders in der Zytomorphologie an. In dem zusammen mit *Aderhold* herausgegebenen Buch über die Nativzytomorphologie maligner Tumoren [107] wird an zahlreichen Beispielen aus der medizinischen Praxis die Leistungsfähigkeit dieser Untersuchungsmethode beschrieben. Die Autoren kommen zu dem Schluß, daß sich die phasenoptische Zytodiagnostik und Histodiagnostik nicht gegenseitig ausschließen, sondern einander ergänzen. Die Histodiagnostik fragt nach dem Begriff des Geschwulstwachstums, die Zytodiagnostik nach dem Begriff der Malignität.

In einer viele Bilder enthaltenden Arbeit befaßt sich *Stoll* [109] mit der Schnelldiagnose durch Phasenkontrastmikroskopie in der gynäkologischen Sprechstunde. Aufgrund umfangreicher



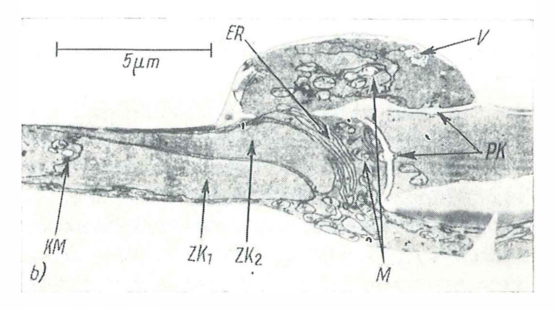


Bild 6.26. Polystictus versicolor

a) letzte phasenoptische Lebendaufnahme 5 Sekunden vor Abtöten der Zelle. M 2300 : 1;
b) die gleiche Stelle nach Fixierung und Ultramikrotomierung im elektronenmikroskopischen Bild. M 4600 : 1 *ER* endoplasmatisches Retikulum; *KM* Kernmembran; *M* Mitochondrium (das im Lebendbild fädige Gebilde ist – wie die räumliche Rekonstruktion ergeben hat – in sich gewellt, so daß der Ultradünnschnitt nur Fragmente wiedergibt, obwohl das Mitochondrium bei der Fixierung als Faden erhalten geblieben ist); *PK* Porenkappe; *V* Vakuole; ZK_1 und ZK_2 Zellkerne (Girbardt in [64])

klinischer Erfahrungen wird über die Bedeutung der Phasenkontrastmikroskopie für wissenschaftlich-gynäkologische Untersuchungen und über die Anwendung dieses Verfahrens in der gynäkologischen Sprechstunde berichtet. Es wird ein genaues Schema angegeben, nach dem die Untersuchungen durchgeführt werden und ein Vergleich der zytologischen Ergebnisse im Frischpräparat und im Papanicolau-Präparat möglich ist.

In der Hämatologie hat das Phasenkontrastverfahren bei der Untersuchung des lebenden bzw. überlebenden gesunden und pathologischen Blutes ganz neue Perspektiven eröffnet. Ist es doch jetzt möglich, das Verhalten des unter verschiedenen Einflüssen stehenden lebenden Blutes über längere Zeit zu beobachten. Die dabei festgestellten morphologischen Veränderungen können für die Diagnose und in der praktischen Medizin von großer Wichtigkeit sein.

Von den zahlreichen Veröffentlichungen auf die-

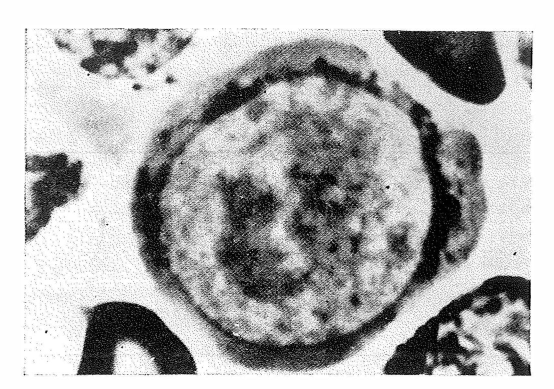


Bild 6.27. Junger Proerythroblast, die Stammzelle der Erythrozyten 2000 : 1 [100]

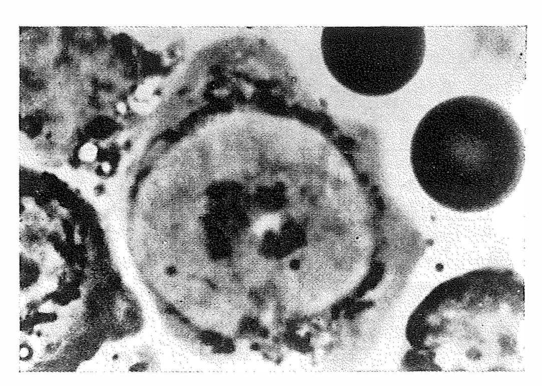


Bild 6.28. Unreife Retikulumzelle. 2000 : 1

sem Gebiet sei besonders auf den von *Rind* [100] erschienenen „Atlas der Phasenkontrasthämatologie“ hingewiesen. Mit wenig Text und viel Bildbeispielen werden zunächst die Stammzellen und die sich daraus entwickelnden Blutzellen in ihren gesunden und pathologischen Formen behandelt. Außerdem werden die Blutbilder einiger typischer Krankheitsfälle aus der klinischen Praxis besprochen. Die aus diesem Atlas entnommenen Bilder 6.27 und 6.28 zeigen einen jungen Proerythroblasten, also die Stammzelle der Erythrozyten, und eine unreife Retikulumzelle mit großem, rundem, blaßgrauem Zellkern, in dem sich drei unregelmäßig begrenzte dunkle Kernkörperchen befinden.

6.1.2.7. Anwendungen in der Technik und Mineralogie, Farbimmersionsmethode

Das Hauptanwendungsgebiet des Phasenkontrastverfahrens liegt zweifellos im Bereich der Biologie und Medizin. Doch ist es auch bei der Untersuchung anorganischer, also toter Materie mit Erfolg eingesetzt worden.

Schon im Jahre 1941 ist von *Loos*, *Klemm* und *Smekal* [92] eine kurze Veröffentlichung über die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens auf Modellversuche zum Polieren von Glas erschienen. *Reumuth* [98] hat an einer Reihe von Mikroaufnahmen der verschiedensten Fasern die Bedeutung des Phasenkontrastverfahrens für die Textilforschung demonstriert. Er untersuchte sowohl natürliche als auch synthetische Fasern im Urzustand und nach Behandlung mit verschiedenen Wasch- und Lösungsmitteln sowie nach Befall von Bakterien und konnte so Strukturen sichtbar machen, die auch mit dem Elektronenmikroskop nicht zu erfassen waren.

Hinsichtlich der Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Chemie seien noch drei Arbeiten genannt.

Wolter [119] führt Gestaltuntersuchungen an festen Körpern, Identitäts- und Reinheitsprüfungen, Messung von Brechzahlen und der Molekularrefraktion, Beobachtungen von Phasenänderungen im thermodynamischen Sinne, besonders von Konzentrationsdifferenzen durch.

Schoon [104] untersucht natürliche Kautschuk-Latices. Es sollten die Teilchengröße und Verteilung bestimmt werden. Da sich die Teilchen im wesentlichen durch geringe Brechzahldifferenz von ihrer Umgebung unterscheiden, ist die reine Hellfeldbeobachtung nur recht schwierig durchzuführen. Erst das Phasenkontrastverfahren führt zum deutlichen Erkennen von Form und Verteilung der Kolloidteilchen und stellt zu der das Objekt u. U. stark verändernden elektronenmikroskopischen Beobachtung die geeignete Kontrollmethode dar.

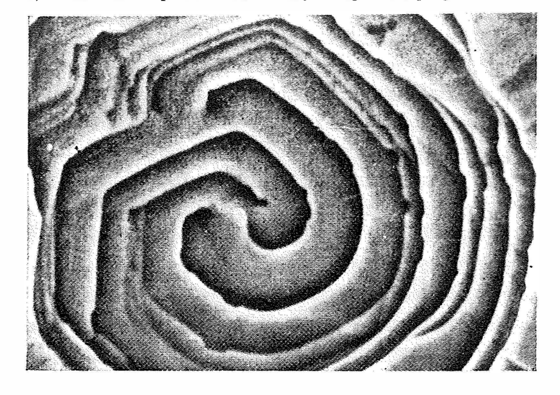
Brandstätter [67] befaßt sich mit dem Spiralabbau der Kristalle durch Verdampfung. Die Abbauformen wurden im Phasenkontrastmikroskop untersucht; dabei wurde festgestellt, daß sie den beim Kristallwachstum bekannten Spiralen und konzentrisch gestuften Figuren vollkommen analog sind. Ausgezeichnete Phasenkontrastaufnahmen von Phenylessigsäure (Bilder 6.29a und b), 2,3-Benzofluoren und Phenantren zeigen die verschiedenen Entwicklungsstadien des Spiralabbaus. Man beachte die Kontrastumkehr bei der Wachstumsspirale a) und der Abbauspirale b).

Ribbe und *Cott* [99] untersuchten im Dunkelfeld und Phasenkontrast die Entmischung in Peristerit-Plagioklas. Diese Beobachtungsverfahren haben sich dabei als ein wichtiges Werkzeug für die mineralogische Forschung erwiesen. Die ent-

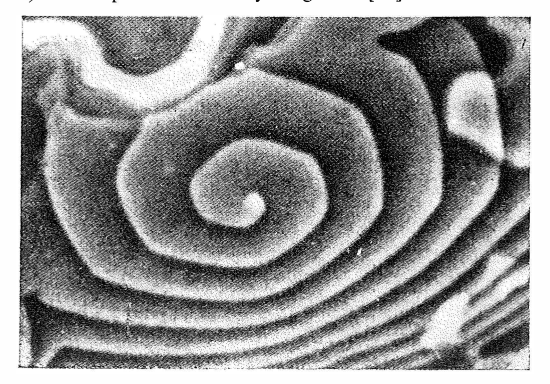
mischten Anteile waren nur noch im Phasenkontrast zu erkennen.
Als eine der heute wohl wichtigsten technischen Anwendungen des Phasenkontrastverfahrens im durchfallenden Licht ist die Brechzahlbestimmung an kleinen Phasenobjekten, wie Glas- oder Mineralteilchen, anzusehen, ähnlich, wie sie schon für die biologisch-medizinischen Anwendungen im Abschn. 6.1.2.6. beschrieben worden ist. Es handelt sich hierbei um die sog. Immersionsmethode.
Das in ein geeignetes Immersionsmittel eingebettete Phasenobjekt wird durch Angleichung beider Brechzahlen zum Verschwinden gebracht und anschließend die Brechzahl des Einbettungsmittels in einem Refraktometer gemessen, das dann im Rahmen der Meßgenauigkeit der Brechzahl des Phasenobjekts entspricht. Das Grundprinzip dieses Verfahrens ist älter als das Phasenkontrastverfahren selbst [70] [72] [108].
Als Kriterium für die Brechzahlgleichheit diente das Verschwinden der Beckeschen Linie, eines hellen Lichtsaums am Objektrand, der durch Beugung, Brechung und Reflexion an durchsichtigen mikroskopischen Objekten beim Defokussieren entsteht, wenn sie sich in ihrer Brechzahl von der Umgebung unterscheiden. Diese Methode ist zwar recht einfach, dafür aber relativ unempfindlich. Man wird im allgemeinen damit zufrieden sein müssen, wenn der Meßfehler eine Einheit in der zweiten Dezimalen nicht übersteigt. Nur unter besonders günstigen Bedingungen sind noch Brechzahlunterschiede von 0,001 zu erkennen. Das Phasenkontrastverfahren liefert dagegen eine um etwa eine Zehnerpotenz höhere Empfindlichkeit, wobei sich die durch die im Abschn. 6.1.2.3. beschriebenen Haloerscheinungen bedingte Kontrastüberhöhung am Objektrand (Bilder 6.16 und 6.17) besonders günstig auswirkt. Bei nicht zu ungünstiger Wahl der Objektgestalt und Objektgröße sind Brechzahlunterschiede von 0,001 noch deutlich und in besonders günstigen Fällen auch solche von 0,0002 bis 0,0001 (Bild 6.30) gerade noch zu erkennen.
Praktisch läßt sich der Brechzahlabgleich durch ein Einbettungsmittel erreichen, das aus zwei kontinuierlich mischbaren Flüssigkeiten unterschiedlicher Brechzahl besteht. Zur Erreichung der genannten Genauigkeit ist jedoch eine genaue Temperaturmessung, sowohl unter dem Mikroskop als auch bei der Brechzahlbestimmung im Refraktometer, unerläßlich, weil die Brechzahlen der als Einbettungsmittel verwendeten Flüssigkeiten (z.B. Immersionsöl + Zimtaldehyd) stark von der Temperatur abhängen. Die Temperaturdifferenz von 1 K ergibt schon eine Brechzahlabweichung von etwa 0,0005. Wie man mit einer neuen Interferenzmethode die Temperaturfehler vermeiden kann, wird im Abschn. 6.1.3. beschrieben.
Andererseits kann man gerade diese Abhängigkeit der Brechzahl von der Temperatur in Form der „Temperaturvariationsmethode“ dazu benutzen, um den Abgleich der Brechzahlen von Objekt und Flüssigkeit zu erreichen. Die Brechzahl des Objekts kann bei den erreichbaren Genauigkeiten als konstant angenommen werden. Es wird mit dem Refraktometer für einige Temperaturen die Brechzahl des Einbettungsmittels bestimmt und in einem engen Temperaturbereich eine Funktion $n = n(T)$ aufgestellt. Da man sich zweckmäßig schon vorher geeignete Flüssigkeitsgemische hergestellt hat, deren Brechzahlen dicht bei der zu erwartenden liegen, ist unter dem Mikroskop nur eine geringe Temperaturvariation erforderlich. Mit der Funktion $n = n(T)$ kann dann leicht

Bild 6.29

a) Wachstumsspirale von Phenylessigsäure [67]



b) Abbauspirale von Phenylessigsäure [67]



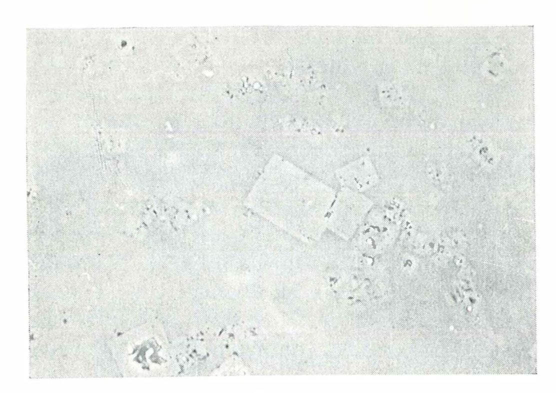


Bild 6.30. Eingebettete Steinsalzkristalle
Kontrastumkehr durch Variation der Wellenlänge des zur Beleuchtung verwendeten Lichts

auf die Normaltemperatur umgerechnet werden.
Bei der λ-Variationsmethode (Bild 6.30) wird mittels des Refraktometers in Verbindung mit einem Monochromator für eine Flüssigkeit hoher Dispersion und einer dem zu untersuchenden Objekt angepaßten Brechzahl die Funktion $n = n(\lambda)$ aufgestellt und dann die Wellenlänge der Beleuchtung variiert, bis das eingebettete Objekt bei Phasenkontrast verschwindet. Damit ist Brechzahlgleichheit erreicht, und mit der Funktion $n = n(\lambda)$ kann auf eine Standardwellenlänge umgerechnet werden. Auch hier ist bei hohen Genauigkeitsansprüchen eine sorgfältige Temperaturkontrolle erforderlich.
Ohne Beleuchtungsmonochromator kommt man bei der Doppelvariationsmethode aus. Für die Beleuchtung genügt ein Satz guter Interferenzfilter. Der genaue Brechzahlabgleich wird bei dieser Methode durch Änderung der Temperatur vorgenommen und mit der Funktion $n = n\,(T, \lambda)$ auf Normaltemperatur und Standardwellenlänge umgerechnet.
Von den zahlreichen durchgeführten Arbeiten zur Brechzahlbestimmung kleiner Teilchen im Phasenkontrast seien nur einige angeführt.
Piller [97] hat eine mit der λ-Variationsmethode durchgeführte Arbeit über die Bestimmung feinkörniger, speziell dünner, transparenter Minerale veröffentlicht. Er konnte aufgrund von Testversuchen mit Materialien bekannter Brechzahl zeigen, daß mit Phasenkontrast, gegenüber Verwendung der Beckeschen Linie, eine Genauigkeitssteigerung von einer Zehnerpotenz erreicht werden kann. Anschließend befaßt sich die Arbeit mit der Möglichkeit der mikroskopischen Bestimmung von Tonmineralien. Es wird empfohlen, gleichzeitig möglichst Teilchen gleicher Größenklasse zu untersuchen.
Im Jahre 1954 hat der Verfasser eine unveröffentlichte Ingenieurarbeit durchführen lassen, die klären sollte, welche Genauigkeit bei der Brechzahlbestimmung nach der Einbettungsmethode im Phasenkontrast zu erreichen ist und welcher Aufwand dafür getrieben werden muß. Die Untersuchungen wurden an Gläsern bekannter Brechzahl nach der Temperaturvariationsmethode durchgeführt. Die Erkennung von kleinen Brechzahlunterschieden ist besonders bei den großen Glasteilchen (> 100 µm) recht gut. Brechzahlunterschiede von 0,0002 sind gut, solche von 0,0001 gerade noch zu erkennen. Um die Brechzahl mit einer Genauigkeit von 0,0001 zu bestimmen, müßte die Temperatur sowohl im Refraktometer als auch am Ort des zu vermessenden Teilchens auf 0,1 K bekannt sein, und das ist, besonders für das Teilchen, schwer zu erreichen.
Bertoldi [61] gibt für die Beckesche Linie eine Empfindlichkeit von 0,002 bis 0,001 und für das von ihm verwendete Anoptralverfahren eine solche von 0,0005 bei 2,5 µm Objektdicke an. Er weist auf die Schwierigkeiten hinsichtlich der Meßgenauigkeit hin, die sich bei der Untersuchung doppelbrechender Materialien ergeben, weil man nicht mit beliebig kleinen Beleuchtungsaperturen arbeiten kann.
Luster [93] verwendet das Phasenkontrastverfahren zur Brechzahlbestimmung anisotroper Teilchen bei starker Vergrößerung. Bei kleinen Teilchen kommt dafür nur die Einbettungsmethode in Frage. Die Differenzierung chemisch stark verwandter Stoffe ist mit der Brechzahlbestimmung oft leichter möglich als mit anderen Methoden, vor allem, wenn nur geringe Substanzmengen zur Verfügung stehen. Bei doppelbrechenden Stoffen, besonders bei optisch zweiachsigen Kristallen, wird die Brechzahlbestimmung etwas schwierig. Man muß jeweils eine der Hauptschwingungsrichtungen zur optischen Achse orientieren und kann durch ein geeignetes Einbettungsmittel, unter Verwendung eines drehbaren Polarisators, die zugehörige Hauptbrechzahl bestimmen.
Als eine besondere Variante der Einbettungsmethode ist die Farbimmersionsmethode anzusehen. Sie ist weniger zur genauen Brechzahlbestimmung, sondern vielmehr zur Differenzierung und Auszählung der Komponenten eines Feinstaubgemisches geeignet. Sie kann sowohl im

Dunkelfeld als auch im Phasenkontrast durchgeführt werden. Bei der ersten Variante benutzt man dafür am besten einen Grenzfall des Dunkelfelds, bei dem schon das um geringe Beträge am Objekt abgebeugte Licht ins Objektiv gelangt. Zu realisieren ist eine solche Anordnung nach Bild 6.6, die auch als Grenzdunkelfeld bezeichnet wird, oder mit dem im Abschn. 6.1.2.5. erwähnten zentralen Dunkelfeld. Bei der zweiten Variante wird zweckmäßig der im Abschn. 6.1.2.4. beschriebene farbige Phasenkontrast benutzt.
Das Grundprinzip der Farbimmersionsmethode soll nach Bild 6.31 erläutert werden.

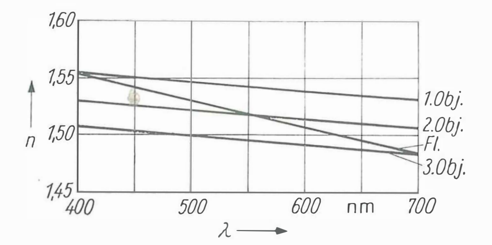


Bild 6.31. Modellvorstellung für die Dispersion dreier eingebetteter unterschiedlicher Phasenobjekte

Es seien drei Phasenobjekte mit unterschiedlichen optischen Eigenschaften in eine Flüssigkeit starker Dispersion eingebettet, und es sei angenommen, daß sich die Dispersionskurve der Flüssigkeit mit denen der Objekte am Anfang, in der Mitte bzw. am Ende schneidet. Da in den Schnittpunkten Brechzahlgleichheit besteht, liefert jedes Objekt für die entsprechende Wellenlänge keinen und für die benachbarten Wellenlängen nur einen geringen gebeugten Lichtanteil. Im Dunkelfeld wird das Bild eines Objekts ausschließlich vom gebeugten Licht erzeugt, d. h., im Bild des ersten Objekts wird Blau, im Bild des zweiten Objekts Grün und in dem des dritten Rot unterdrückt. Somit erscheint das erste Objekt in einem Rot, das mit etwas Grün vermischt ist, also Gelb oder Orange. Beim zweiten Objekt entsteht eine Farbe, die sich im wesentlichen aus Rot und Blau zusammensetzt, also Purpur. Die Farbe des dritten Objekts setzt sich aus Blau mit einem Grünanteil zusammen. Es erscheint also in einem Blaugrün. Das sind drei Farben, die von einer einigermaßen farbtüchtigen Person sofort unterschieden werden können. Es lassen sich auch noch weitere dazwischenliegende Farben mit Sicherheit erkennen und damit noch mehr Komponenten eines Mineralstaubgemisches durch

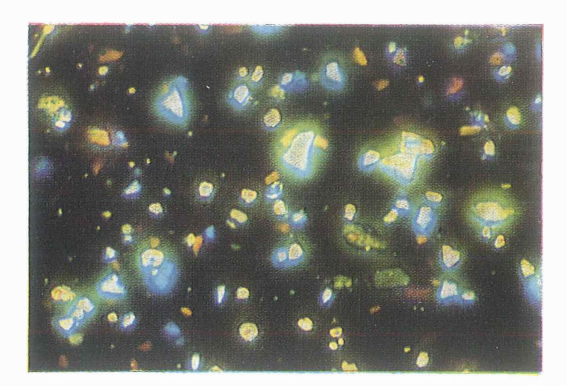
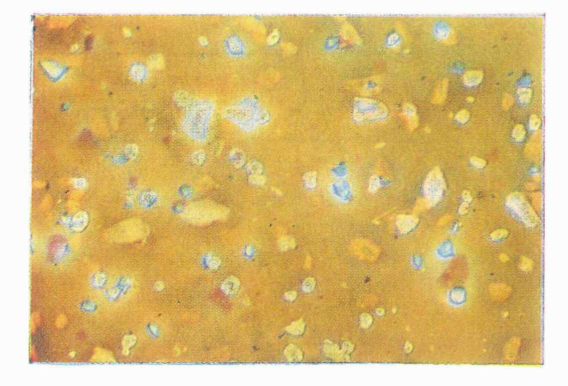


Bild 6.32. Mineralfraktion mit den Bestandteilen Orthoklas, Quarz, Plagioklas, Biotit und Augit im zentralen Dunkelfeld bei Einbettung in ein Gemisch von Immersionsöl + Zimtaldehyd mit $n_D = 1{,}550$. M 40:1

ihre Farben unterscheiden (Bild 6.32). Die Durchführung der Farbimmersionsmethode im farbigen Phasenkontrast bringt, besonders bei den kleinsten Teilchen, gegenüber dem Dunkelfeld deutliche Vorteile. Es erscheinen jedoch etwas andere Farben (Bild 6.33).
Weitere Einzelheiten zu diesem Thema, besonders zu seiner farbmetrischen Behandlung, können aus [63] [64] entnommen werden.
Die Bilder 6.32 und 6.33, wo eine aus fünf Komponenten Orthoklas, Quarz, Plagioklas, Biotit und Augit bestehende, in Immersionsöl + Zimtaldehyd eingebettete Mineralfraktion im Dunkelfeld und farbigen Phasenkontrast dargestellt ist, geben ein praktisches Beispiel für die Anwendung der Farbimmersionsmethode. Die zugehörigen Dispersionskurven werden im Bild 6.34 gezeigt. Sowohl im Dunkelfeld als auch im farbigen Phasenkontrast sind die fünf Komponenten aufgrund

Bild 6.33. Wie Bild 6.32, jedoch im farbigen Phasenkontrast mit $t^2 = 0{,}25$



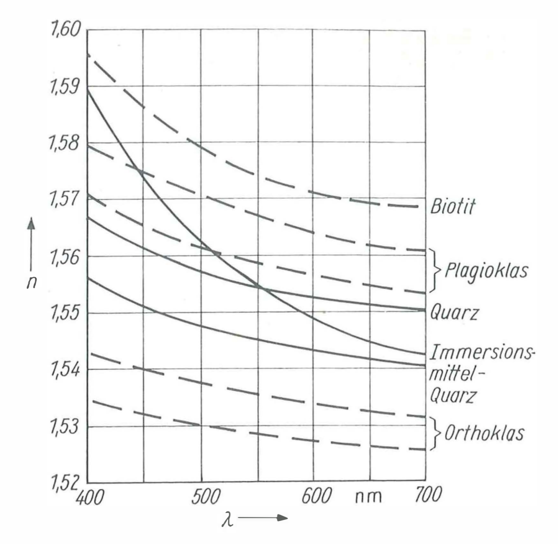


Bild 6.34. Dispersionskurven zu den Bildern 6.32 und 6.33

ihrer Farben deutlich zu unterscheiden, wodurch eine einfache Auszählung der Mengenanteile durch Hilfskräfte ermöglicht wird. Die Farben, in denen die einzelnen Bestandteile erscheinen, sind in Tafel 6.1 zusammengestellt.

Von verschiedenen Autoren ist in den letzten 10 bis 15 Jahren die Farbimmersionsmethode im Dunkelfeld und Phasenkontrast als wichtiges Hilfsmittel für die Feinstaubanalyse empfohlen worden; so u.a. von *Thaer* [112] [113], der besonders Feinstäube des Kohlenbergbaus untersuchte und zuverlässige Kriterien zur Bestimmung von Quarz und Silikatgruppen bis zu einer Korngröße von 1 μm erhielt.

Schmidt [101] [102], *Heidermanns* [85] sowie *Schmidt* und *Heidermanns* [103] haben Diagramme veröffentlicht, mit deren Hilfe es möglich ist, die Brechzahl der einzelnen Körner abzuschätzen.

Grigorovici und *Manaila* [81] untersuchten im Phasenkontrast nichteingebettete NH_4Cl-Kristalle, die im Dickenbereich von 0,4 bis 3 μm gefärbt erscheinen. Ihre Farben sind farbmetrisch ausgewertet worden.

Kalk [89] empfiehlt die Farbimmersionsmethode im Phasenkontrast und Dunkelfeld für Untersuchungen in der Bodenmineralogie.

Hinsichtlich weiterer Anwendungen muß auf die Literatur verwiesen werden.

Tafel 6.1. Farbige Darstellung der Mineralfraktionen nach den Bildern 6.32 und 6.33

Bestandteil	Dunkelfeld	Farbiger Phasenkontrast
Orthoklas	Hellblau bis Weißlichblau	Hellblau bis Weiß
Quarz	Dunkelblau	Purpur
Plagioklas	Rot	Orange bis Rosa
Biotit	Gelblichbraun mit grünem Hof	Gelb
Augit	Weiß mit dunklen Streifen	Weiß mit dunklen Streifen

6.1.3. Interferenzmikroskopie (Durchlicht) [135]

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

6.1.3.1. Aufgabenbereich und allgemeine Grundlagen

Neben den rein qualitativen Methoden haben zunächst solche quantitativen Untersuchungen, wie das Messen und Vergleichen von Längen und die Ermittlung von Größenverteilungen unter dem Mikroskop immer größere Verbreitung gefunden. In den letzten Jahrzehnten sind solche mikroskopischen Methoden stärker in den Vordergrund gerückt, für die die dritte Dimension, also die Tiefenausdehnung und die Stoffeigenschaften wesentlich sind. Zu diesen Methoden gehört die vor allem für genaue Dicken- und Brechzahlbestimmungen besonders geeignete Interferenzmikroskopie.

Im strengen Wortsinn ist jede Mikroskopie Interferenzmikroskopie, da das mikroskopische Bild durch Interferenz des direkten und des am Objekt gebeugten Lichts entsteht. Unter Interferenzmikroskopie im engeren Sinne versteht man ein mikroskopisches Abbildungsverfahren, bei dem eine vom Objekt unabhängige Aufspaltung und Wiedervereinigung des Strahlengangs erfolgt mit dem Ziel, Phasenobjekte kontrastreich darzustellen und die von ihnen hervorgerufenen Gangunterschiede mit hoher Genauigkeit zu messen.

Diese Aufspaltung und Wiedervereinigung kann sehr unterschiedlich realisiert werden. Man kann z. B., wie im Bild 6.35 dargestellt ist, den Strahlengang schon vor der Objektebene *1* aufspalten und den Vergleichsstrahlengang um das Objekt herumführen (Mach-Zehnder-Interferometer), so daß dieser vom Objekt nicht beeinflußt wird und in der Zwischenbildebene zwei Wellenfronten zur Interferenz kommen, von denen nur der einen

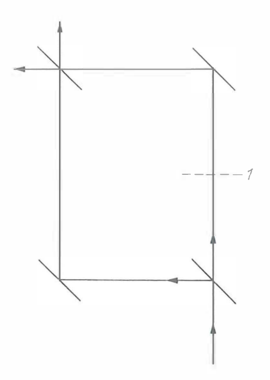


Bild 6.35. Schema einer interferenzmikroskopischen Anordnung nach dem Mach-Zehnder-Prinzip
1 Objektebene

Objektstrukturen aufgeprägt sind. Diese Anordnung wird auch als „round the square" bezeichnet.

Beim sog. Shearing-Verfahren (Bild 6.36) werden zwei durch getrennte Objektpunkte O_1 und O_2 gegangene Strahlen in der Zwischenbildebene vereinigt, so daß dort zwei seitlich verschobene Bilder des gleichen Objekts entstehen, die miteinander interferieren und für genaue Gangunterschiedsmessungen benutzt werden können.

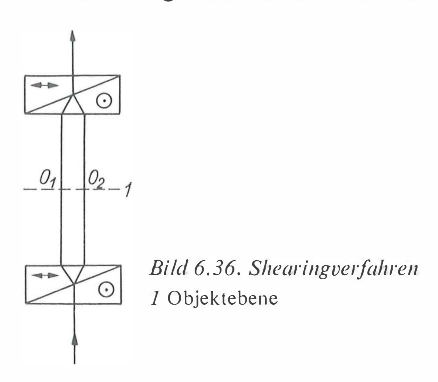


Bild 6.36. Shearingverfahren
1 Objektebene

Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile, die gegeneinander abgewogen werden müssen. Die erste ist im Prinzip einwandfrei, erfordert aber einen sehr großen technischen Aufwand, wenn man auch mit starken Objektiven genaue Gangunterschiedsmessungen durchführen will. Die zweite Methode läßt sich technisch wesentlich leichter realisieren. Ihr Nachteil besteht darin, daß im Vergleichsstrahlengang stets Objektstrukturen enthalten sind, was besonders bei stark strukturierten Präparaten zu ernsthaften Schwierigkeiten bei der Deutung und Auswertung des Interferenzbilds führen kann.

Eine dritte Methode, das „Interphakoverfahren", steht zwischen den beiden erstgenannten. Bei ihm wird der Vergleichsstrahl zwar vom Objekt beeinflußt, doch werden die der Vergleichswelle aufgeprägten Objektstrukturen durch geeignete Anordnung von Blenden wieder herausgefiltert, so daß, wie im ersten Fall, die Vergleichswelle keine Objektstrukturen trägt. Diese Methode ist allerdings nur für relativ kleine Objekte bzw. feine Objektstrukturen anwendbar.

6.1.3.2. Grundprinzipien zur praktischen Durchführung der Interferenzmikroskopie

Für die Interferenzmikroskopie sind nur Phasenstrukturen geeignet; denn reine Amplitudenobjekte löschen das auftreffende Licht entweder vollständig aus, dann ist in der Bildebene kein vom Objekt ausgegangener Interferenzpartner vorhanden, oder sie löschen das Licht nur z.T. aus, erteilen ihm aber keinen relativen Gangunterschied.

Die eigentliche Aufgabe der Interferenzmikroskopie ist es aber, im mikroskopischen Präparat Phasenobjekte kontrastreich darzustellen und genaue Gangunterschiedsmessungen durchzuführen. An Mischobjekten lassen sich ebenfalls Gangunterschiedsmessungen durchführen, wenn z.B. wie im Bild 3.2 das Amplitudenverhältnis der interferierenden Anteile, d.h. die relative Durchlässigkeit, nicht zu stark von Eins abweicht.

Im Bild 6.37a ist ein Durchlichtobjekt mit der Brechzahl n_2 in ein Medium der Brechzahl n_1 eingebettet; seine Dicke sei d. Dann ist der relative Gangunterschied des Objekts zur Umgebung

$$\Delta = d(n_2 - n_1) = d\,\Delta n. \tag{6.8}$$

Bei Höhenunterschieden (Bild 6.37b) gilt auch Gl. (6.8), weil für den Gangunterschied nur der Höhenbereich maßgebend ist, in dem das Objekt gegenüber der Umgebung unterschiedliche Brechzahl hat.

Durch eine solche Gangunterschiedsmessung läßt

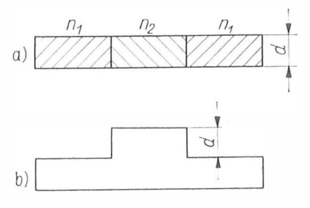


Bild 6.37. Zur Definition des Gangunterschieds

sich immer nur das Produkt aus Dicke d und Brechzahldifferenz Δn bestimmen. Bei bekannter Dicke ergibt sich daraus die Brechzahldifferenz Δn und bei bekannter Brechzahldifferenz die Dicke d. Später wird noch genauer beschrieben werden, wie durch zwei Interferenzmessungen sowohl d als auch Δn bestimmt werden können.
Gangunterschiedsmessungen haben besonders in der Zytologie zur Bestimmung der Trockensubstanz in Zellkernen sowie zur Brechzahl- und Dickenbestimmung an dünnen Schichten sowie Glas- und Plastfasern große Bedeutung erlangt. Durch einfache Zusatzgeräte bietet die Interferenzmikroskopie auch die Möglichkeit, genaue Brechzahlbestimmungen an Flüssigkeiten und damit, nach der im Abschn. 6.1.2.7. beschriebenen Immersionsmethode, an Körnerpräparaten durchzuführen.

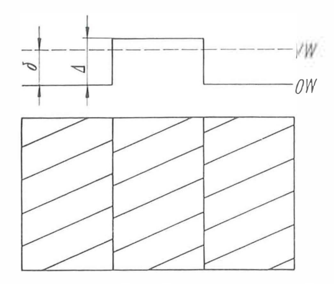


Bild 6.38. Zur Entstehung des Interferenzbilds und Erläuterung des Meßprinzips, wenn die Vergleichswelle vom Objekt nicht beeinflußt und das Bild des Objekts von Interferenzstreifen überlagert wird

Bei den interferenzmikroskopischen Anordnungen der ersten und dritten Art tritt als Vergleichswelle *VW* eine ebene Welle ohne Objektstrukturen auf, die, wie im Bild 6.38 gezeigt wird, in der Zwischenbildebene mit der durch das Objekt von Bild 6.37 deformierten Objektwelle *OW* zur Interferenz gelangt. Der Bildkontrast hängt von dem Gangunterschied des Objekts Δ und dem mit einem Phasenschieber veränderbaren Gangunterschied δ zwischen *VW* und *OW* ab. Das Meßprinzip ist denkbar einfach (Bild 6.38 oben). Im monochromatischen Licht wird δ so variiert, daß nacheinander Umgebung und Objekt mit größter Dunkelheit erscheinen, sich also die zusammentreffenden Lichtwellen durch Interferenz auslöschen. Das heißt, zunächst wird $\delta = \delta_1 = \lambda/2$ und dann $\delta_2 - \Delta = \lambda/2$, also $\delta_2 = \Delta + \lambda/2$ eingestellt. Die Differenz beider Einstellungen $\delta_2 - \delta_1 = \Delta$ gibt den relativen Gangunterschied des Objekts.

Die entsprechende Messung kann auch im weißen Licht durchgeführt werden. Als Index dient in diesem Fall die sog. „teint sensible", die empfindliche Farbe. Das ist eine Purpurfarbe, in der weder Blau noch Rot überwiegt und die entsteht, wenn das komplementäre Grün durch Interferenz ausgelöscht wird. Auf diese Farbe läßt sich sehr empfindlich einstellen; schon kleine Farbabweichungen werden deutlich wahrgenommen.
Werden *VW* und *OW* gegeneinander geneigt, so entstehen Interferenzstreifen (Bild 6.38 unten), die durch das Objekt, entsprechend der Größe des von ihm hervorgerufenen Gangunterschieds, ausgelenkt werden. Diese Auslenkung kann entweder direkt im Bild als Bruchteil bzw. als ein Vielfaches eines Interferenzstreifenabstands oder mit einem Phasenschieber ausgemessen werden.
Bei den interferenzmikroskopischen Anordnungen der zweiten Art geht auch der Vergleichsstrahlengang durch die Objektebene.
Mit Hilfe eines geeigneten optischen Elements wird durch seitliche Verschiebung der beiden Wellenfronten (Bild 6.39) ein Doppelbild erzeugt. Für Meßzwecke wird vorwiegend das Shearingverfahren mit totaler Bildaufspaltung verwendet, bei der der Betrag der Bildaufspaltung a größer als die laterale Ausdehnung des Objekts ist. Doch wollen wir auch bei großflächigen Objekten die Aufspaltung als total bezeichnen, wenn sie, unabhängig von der Objektgröße, ein Vielfaches der Auflösungsgrenze des Objektivs beträgt.

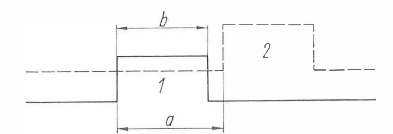


Bild 6.39. Shearingverfahren mit totaler Bildaufspaltung

Die Messung wird zunächst in entsprechender Weise wie oben durchgeführt. Ist jedoch das Vergleichsbild *2* dem Objektbild *1* in der Qualität gleichwertig, und liegt das Objekt in einer homogenen Umgebung, dann läßt sich die Meßgenauigkeit verdoppeln, indem man nicht zwischen Bild und Umgebung, sondern von einem zum andern Teilbild mißt. Man stellt zunächst nach Bild 6.40a das erste und dann nach Bild 6.40b das zweite Bild auf größte Dunkelheit ein, d. h.,

$$\delta_2 - \Delta = \lambda/2, \quad \text{also} \quad \delta_2 = \Delta + \lambda/2$$
$$\delta_3 + \Delta = \lambda/2, \quad \text{also} \quad \delta_3 = -\Delta + \lambda/2.$$

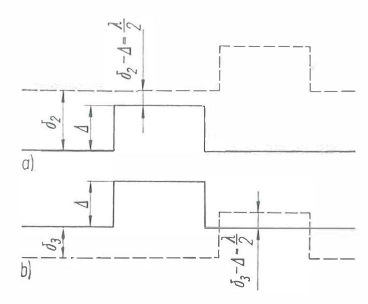


Bild 6.40. Gangunterschiedsmessungen beim Shearing-verfahren

Daraus ergibt sich der Gangunterschied

$$\Delta = \frac{\delta_2 - \delta_3}{2}.$$

Ein solcher Phasenschieber ist meist mit einer Teilung versehen, die sich leicht eichen läßt, denn zwei aufeinanderfolgende Dunkelstellungen der gleichen Präparatstelle entsprechen einem Gangunterschied von einer Lichtwellenlänge λ.

Das Shearing-Verfahren wird auch als sehr empfindliche Kontrastmethode zur Erzeugung eines Reliefkontrastes verwendet. Beispiele dafür sind in den Bildern 6.41a bis c dargestellt. In diesem Fall wird die laterale Bildaufspaltung sehr klein gewählt, kleiner als das zu untersuchende Objekt, etwa in der Größenordnung der Auflösungsgrenze des Objektivs. Man spricht in diesem Fall von differentieller Aufspaltung. Im Fall eines stufenförmigen Objekts (Bild 6.41a) sieht man links einen schmalen hellen und rechts einen schmalen dunklen Streifen oder umgekehrt, da der Gangunterschied beider Wellenfronten in diesen Bereichen entgegengesetztes Vorzeichen hat. Im Fall von Bild 6.41b, d.h. bei einem Phasenobjekt mit kontinuierlich sich änderndem optischem Weg, hat der Gangunterschied links und rechts ebenfalls entgegengesetztes Vorzeichen. Der Gangunterschied und damit die Helligkeit hängt aber jetzt von dem Gradienten des optischen Wegs (z.B. der Änderung von Brechzahl oder Dicke), d.h. von der Richtung der Tangente an die Kurve von Bild 6.41b, ab. Bei trapezförmigem Profil der Wellenfronten (Bild 6.41c) läßt sich der Böschungswinkel ε des erzeugenden Objekts, z.B. einer trapezförmigen Furche, bestimmen. Bei bekannter Größe a der lateralen Bildaufspaltung wird der Gangunterschied Δ bestimmt und nach $\tan \varepsilon = \Delta / a$ der Böschungswinkel des Profils der Wellenfläche berechnet.

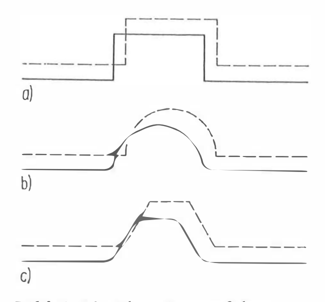


Bild 6.41. Shearingverfahren mit differentieller Bildaufspaltung

Weitere Einzelheiten über die Durchführung von Interferenzmessungen werden im Abschn. 6.1.3.4. über die Anwendungen besprochen.

6.1.3.3. Einige Interferenzanordnungen, die praktische Bedeutung erlangt haben

Die im Abschn. 6.1.3.1. nur kurz beschriebenen Grundtypen von Interferenzanordnungen lassen sich durch Kombination geeigneter optischer Elemente realisieren. Doch nicht jede dieser möglichen Kombinationen führt zu einem für die Praxis brauchbaren Interferenzmikroskop. Die wichtigsten Merkmale einer leistungsfähigen interferenzmikroskopischen Anordnung sind die Bildqualität bei Verwendung starker Objektive, die Stabilität, die Bedienbarkeit und die Meßgenauigkeit. Von Wichtigkeit ist auch die zur Erreichung brauchbarer Meßergebnisse notwendige Präparierung, die für verschiedene Interferenzanordnungen sehr unterschiedlich sein kann. Das gleiche gilt auch für die Auswertung der Meßergebnisse.

Interferenzmikroskopische Anordnungen ohne Beeinflussung des Vergleichsstrahlengangs durch das Objekt

Für die Durchlichtinterferenzmikroskopie ist bevorzugt das schon im Abschn. 6.1.3.1. erwähnte Mach-Zehnder-Interferometer angewendet worden. Es läßt sich vor oder hinter dem Objektiv anordnen. Letzteres kann sich aber auch innerhalb des Interferometers befinden (Bild 6.43).

Interferenzmikroskop nach *Krug* und *Lau* [157] [158]

Von *Krug* und *Lau* sind einige relativ einfache und stabile Anordnungen vorgeschlagen worden. Bild 6.42 gibt dafür ein Beispiel. Seine Wirkungsweise kann nach den vorangegangenen Betrachtungen aus der schematischen Darstellung ent-

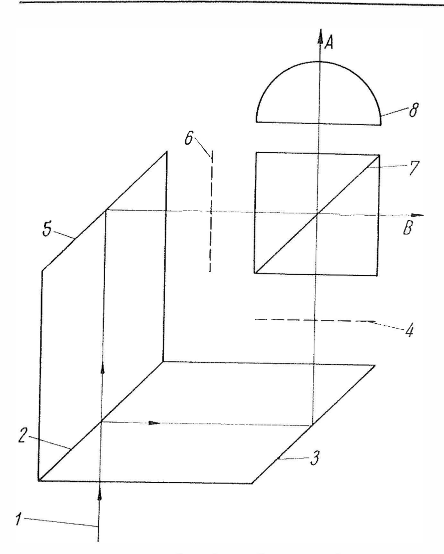


Bild 6.42. Durchlichtinterferenzmikroskop nach Krug und Lau

1 einfallender Strahl; *2* erste Teilungsfläche; *3* und *5* reflektierende Prismenflächen; *4* Objektebene; *6* zu *4* konjugierte Ebene; *7* zweite Teilungsfläche; *8* Objektiv

nommen werden. Der wesentliche Vorteil dieser Anordnung ist, daß nur ein Objektiv benötigt wird und sich im Interferometer keine abbildende Optik befindet, so daß keine ernsten Justierschwierigkeiten auftreten. Allerdings wird man zur Erzeugung eines homogenen Interferenzfelds zum optischen Abgleich nach *6* ein dem in *4* gelegenen Präparat entsprechendes Leerpräparat bringen müssen.
Die Objektivapertur wird durch den vor dem Objektiv angeordneten Teilungswürfel und die Beleuchtungsapertur durch die verkitteten rhombischen Prismen beschränkt, so daß die Verwendung stärkster Objektive nicht möglich ist.

Leitzsches Interferenzmikroskop nach *Horn* [150]

Höhere Aperturen können erreicht werden, wenn man die abbildende Optik in das Interferometer bringt. Nach diesem Prinzip ist das von *Horn* vorgeschlagene Leitzsche Interferenzmikroskop gebaut worden, das wohl z.Z. das Spitzengerät in dieser Klasse darstellt.
Es hat, wie in den Bildern 6.43 und 6.44 gezeigt wird, je ein Objektiv- und Kondensorpaar innerhalb einer Mach-Zehnder-Anordnung. Es können die stärksten Objektivaperturen und prinzipiell auch die stärksten Beleuchtungsaperturen verwendet werden. Zu starke Beleuchtungsaperturen würden jedoch (wegen des geminderten Bildkontrastes und größerer Meßfehler) keine Vorteile bringen; deshalb ist die Beleuchtungsapertur auf 0,3 beschränkt worden. Wegen der großen Wege, die die Teilstrahlen getrennt verlaufen, ist zunächst zur Erhaltung eines bestimmten Justierzustands ein sehr stabiles Stativ erforderlich. Außerdem muß zur Erreichung eines homogenen Interferenzfeldes völlige Symmetrie des Interferometers angestrebt werden. Voraussetzung dafür ist die Verwendung besonders ausgesuchter und gepaarter Objektive und Kondensoren. Denn hier spielen, auch bei gleichen Objektiv- und Kondensortypen, schon die Fertigungstoleranzen eine wesentliche Rolle. Aus dem gleichen Grund muß sich im Vergleichsstrahlengang bei *4′* stets ein dem in *4* gelegenen Präparat optisches Äquivalent, das schon erwähnte Leerpräparat, befinden. Um die dann noch verbleibenden Restfehler zu kompensieren, sind verschiedene schwenkbare Justier-

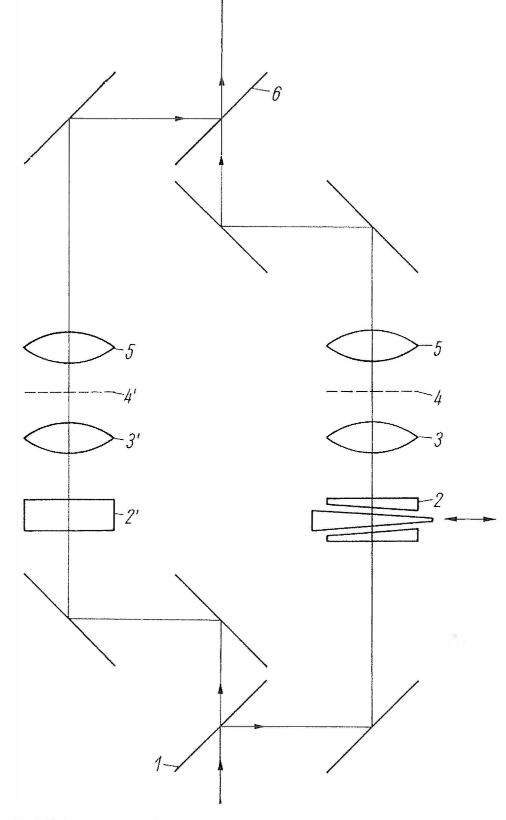


Bild 6.43. Optisches Schema des Leitzschen Interferenzmikroskops nach dem Mach-Zehnder-Prinzip

1 erste Teilungsfläche; *2* und *2′* Kompensationskeil und Kompensationsplatte; *3* und *3′* Kondensor; *4* und *4′* Objekt und Vergleichsobjekt; *5* Objektiv; *6* zweite Teilungsfläche

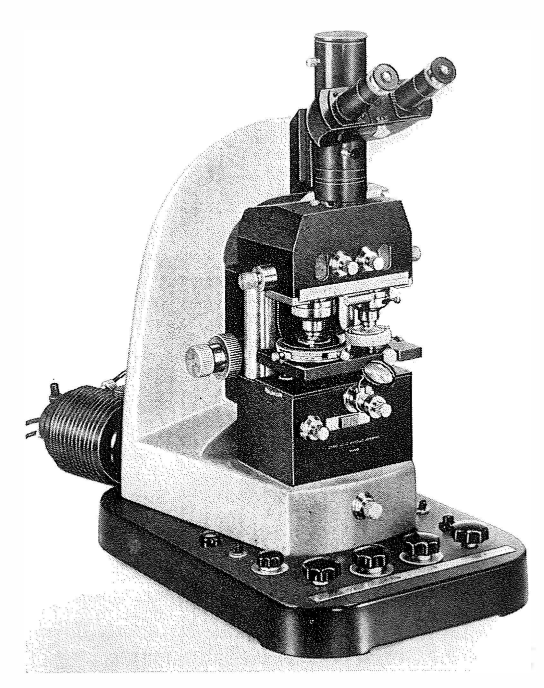


Bild 6.44. Das Leitzsche Interferenzmikroskop nach dem Mach-Zehnder-Prinzip
Werkfoto

platten vorgesehen, die gleichzeitig dazu dienen, entweder ein homogenes Feld oder Interferenzstreifen im Feld mit gewünschtem Abstand und gewünschter Richtung einzustellen. Für die Durchführung genauer Gangunterschiedsmessungen wird ein Keilkompensator benutzt, der meßbar verstellt werden kann.

Die wesentlichen Vorteile dieses Interferenzmikroskops bestehen in der Verwendung stärkster Objektive bei vollständiger Trennung von Objekt- und Vergleichsstrahlengang, wodurch die Auswertung der Interferenzbilder erleichtert wird. Bei einwandfreier Justierung überlagert sich der der Objektwelle aufgeprägten Objektstruktur eine ebene Welle, so daß die Phasenstrukturen direkt sichtbar gemacht und quantitativ ausgemessen werden können. Die Lichtverluste sind gering, weil sich nur eine Teilungsfläche im Abbildungsstrahlengang befindet.

Der Nachteil liegt in der etwas schwierigen Justierung, die zur Erreichung eines einwandfreien Meßergebnisses notwendig ist.

Interferenzmikroskop nach *Dyson* [140] bis [142]

Von der Firma Cook, Troughten and Simms, England, wird eine von *Dyson* vorgeschlagene Anordnung vertrieben, die einem normalen Mikroskopobjektiv vorgeschaltet wird. Sie arbeitet nach dem Prinzip eines Jamin-Interferometers mit rotationssymmetrischer Beleuchtung.

Es erfolgt nach Bild 6.45 eine Aufspaltung und z.T. eine Wiedervereinigung der Strahlen durch innere Reflexion an zwei schwach keilförmigen Glasplatten *2* und *3* mit sehr gut ebenen Oberflächen. Die Hauptbestandteile sind die beiden Glasplatten und der mit *3* verkittete Spiegelkörper *4*, dessen Kugelfläche *9* bis auf einen kleinen zentralen Fleck voll verspiegelt ist. Die Flächen *6*, *7* und *8* sind halbdurchlässig und der zentrale Teil der Fläche *5* undurchlässig verspiegelt.

Der einfallende Strahl *1* wird an der Fläche *6* in die Teilstrahlen *11* und *12* aufgespaltet, die nach Reflexion an den Flächen *8* bzw. *5* und Durchlaufen gleicher optischer Wege an der Fläche *7* wieder vereinigt werden. Der Kugelspiegel vermittelt eine gleichzeitige Abbildung der Objektebene *10* und der Vergleichsfläche *5* im Maßstab 1:1 in die Objektebene *10'* des Objektivs *13*, so daß in dieser Ebene ein Interferenzbild (Interferenzstreifen oder Interferenzkontrast) des in der Objektebene *10* befindlichen Phasenobjekts entsteht. Es schließt sich dann eine ganz normale Hellfeldabbildung an. Die Zentralblende auf der Fläche *8* sorgt dafür, daß nur am Spiegel *9* reflektiertes Licht nach *10'* gelangt, was dem optischen Weg der am Objekt vorbeigehenden Vergleichsstrahlen entspricht. Die Keilplatte *2* läßt sich um geringe Beträge in Richtung *A* kippen, um Interferenzstreifen oder homogenes Feld einstellen zu können. Zur Drehung der Interferenzstreifen und

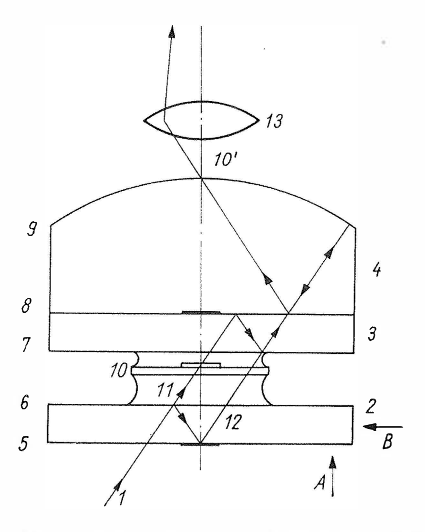


Bild 6.45. Interferenzanordnung nach Dyson

zur Feinjustierung ist der Spiegelkörper *4* mit der verkitteten Keilplatte *3* um die optische Achse drehbar angeordnet. Durch Verschieben der Keilplatte *2* senkrecht zur optischen Achse läßt sich der Gangunterschied zwischen den Strahlen *11* und *12* sehr empfindlich ändern. So können die Kontraste variiert und sehr genaue Gangunterschiedsmessungen durchgeführt werden.
Die wesentlichen Vorteile dieser Anordnung sind die kompakte Bauart, die Tatsache, daß Objekt- und Vergleichsstrahlengang, nur z. T. etwas seitlich versetzt, die gleichen optischen Elemente passieren, und die Möglichkeit der Verwendung normaler Objektive höchster Apertur. Außerdem handelt es sich um ein relativ billiges Zusatzgerät zu normalen Durchlichtmikroskopen.
Dem stehen folgende Nachteile gegenüber: Beschränkung des Sehfelds wegen des bei der Abbildung durch eine Kugelfläche unvermeidlichen außeraxialen Astigmatismus und den das Objekt umgebenden Kegel der Vergleichsstrahlen, die zentrale Ausblendung der beleuchtungs- und abbildungsseitigen Apertur, Entstehung von zusätzlichem Streulicht, besonders wegen des bei der ersten Reflexion an Fläche *8* hindurchgelassenen, nicht gezeichneten Anteils, und die etwas schwierige Handhabung, weil das Präparat stets beiderseitig in Immersionsöl eingebettet werden muß.

Interferenzmikroskopische Anordnungen mit Beeinflussung des Vergleichsstrahlengangs durch das Objekt

Interferenzmikroskop nach *Jamin-Lebedeff* [159]

Schon im Jahre 1868 hat *Jamin* eine Interferenzanordnung angegeben, die 1930 von *Lebedeff* ausführlicher beschrieben und für die Interferenzmikroskopie nutzbar gemacht wurde. Sie hat als Grundlage zur Konstruktion mehrerer leistungsfähiger, nach der Shearingmethode arbeitender Interferenzmikroskope gedient. Ihr Grundprinzip (Bild 6.46) kann wie folgt beschrieben werden.
2 und *5* seien zwei gleiche, unter *45°* zur optischen Achse geschnittene planparallele Kalkspat- oder Quarzplatten. Von unten falle unter 45° zur optischen Achse von *2* schwingendes linear polarisiertes monochromatisches Licht senkrecht in *2* ein. In *2* wird jeder einfallende Strahl in den ordentlichen *O* und den außerordentlichen *AO* aufgespaltet. Nur der außerordentliche Strahl wird bei senkrechtem Einfall gebrochen. Beide sind senkrecht zueinander polarisiert und verlassen räumlich getrennt als Parallelstrahlen die

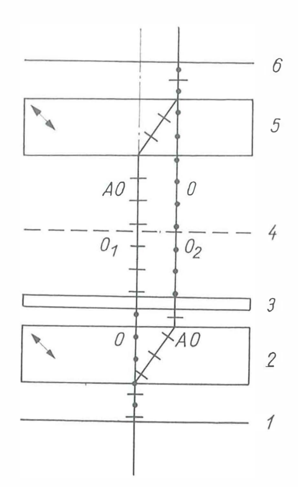


Bild 6.46. Polarisationsinterferometer nach Jamin-Lebedeff

1 Polarisator; *2* und *5* gleiche Kalkspat- oder Quarzplatten; *3* $\lambda/2$-Platte; *4* Objektebene; *6* Analysator

Platte *2*. Durch die polarisationsoptische $\lambda/2$-Platte *3* wird die Schwingungsrichtung beider Strahlen um 90° gedreht, wodurch für die zweite Kristallplatte *5* der bisher ordentliche zum außerordentlichen wird und umgekehrt der bisher außerordentliche zum ordentlichen. Der in *2* gebrochene Strahl geht ungebrochen durch *5* hindurch, während der in *2* ungebrochene Strahl in *5* gebrochen wird, so daß beide Strahlen hinter *5* wieder vereinigt werden. Mit einer nachfolgenden Optik wird die Objektebene *4* abgebildet und man erhält ein Doppelbild, das, auf die Objektebene bezogen, um den Betrag O_1O_2 aufgespaltet ist. Da beide Bilder senkrecht zueinander polarisiert sind, lassen sie sich mit polarisationsoptischen Hilfsmitteln unterschiedlich beeinflussen und zu genauen Gangunterschiedsmessungen an durchlässigen Objekten benutzen.
Da die Schwingungsrichtung des Polarisators um 45° zur optischen Achse von *2* orientiert ist, wird

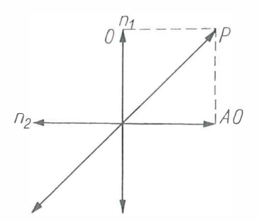


Bild 6.47. Aufspaltung des linear polarisierten Lichts durch die Kristallplatte in seine Komponenten O und AO

das polarisierte Licht P in die ordentliche und die außerordentliche Komponente O und AO aufgespaltet. Mit P, O und AO seien gleichzeitig die Amplituden bezeichnet (Bild 6.47). In diesem Fall haben O und AO die gleiche Größe.

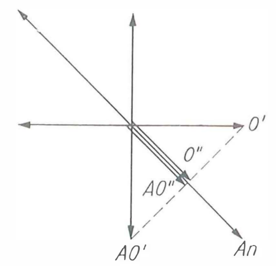


Bild 6.48. Durchgang durch den Analysator

Den Analysator An (Bild 6.48) können nur die in Schwingungsrichtung desselben liegenden Komponenten O'' und AO'' passieren und zur Interferenz gelangen. Sind die optischen Wege für den ordentlichen und den außerordentlichen Strahl gleich, dann tritt aus *5* wieder linear polarisiertes Licht aus.

Besteht zwischen AO'' und O'' eine Phasendifferenz von 180°, dann sind die Komponenten dem Betrag nach gleich, aber entgegengesetzt gerichtet, und wir erhalten Auslöschung. Bei beliebiger Phasendrehung sind AO'' und O'' vektoriell unter Berücksichtigung des Phasenwinkels zu addieren, um die resultierende Amplitude zu erhalten. Im allgemeinen ergibt sich dann elliptisch polarisiertes Licht (s.a. Abschn. 6.1.4.).

Aus Qualitätsgründen werden bei den nach dem Jamin-Lebedeff-Prinzip aufgebauten modernen Interferenzmikroskopen (Opton, Leitz) [145] [160] spezielle Objektive und Kondensoren verwendet, bei denen die damit kombinierten Kalkspatplatten mit den Frontlinsen verkittet und in der Korrektion berücksichtigt worden sind. Damit sind auch hohe Objektivaperturen bei relativ großer Bildaufspaltung zu erreichen.

Das nach diesem Prinzip arbeitende Interferenzmikroskop der Firma Opton, Oberkochen, wird im Bild 6.49 gezeigt und das optische Schema im Bild 6.50. Da im polarisierten Licht gearbeitet werden muß und für Gangunterschiedsmessungen die von der Polarisationsmikroskopie her bekannten Kompensatoren verwendet werden, wird ein vollständiges Polarisationsmikroskop zugrunde gelegt. Durch Verwendung von drei achromatischen Spezialobjektiven 10/0,22; 40/0,65 und 100/1,00 mit den zugehörigen Kondensoren und den wie im Bild 6.46 angeordneten polarisationsoptischen Elementen wird ein solches

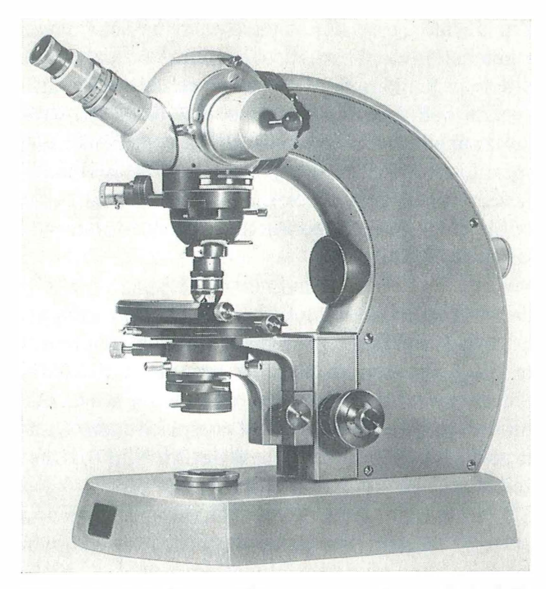


Bild 6.49. Interferenzmikroskop nach Jamin-Lebedeff
Opton, Oberkochen, am Stand. Universal Pol, Werkfoto

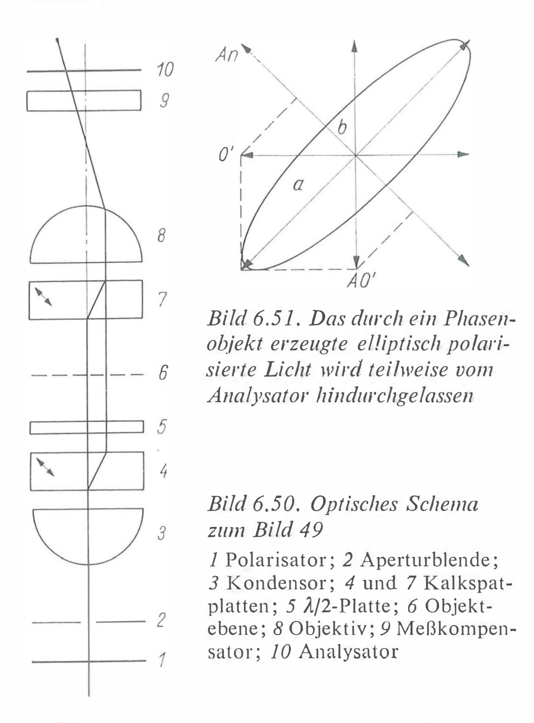


Bild 6.51. Das durch ein Phasenobjekt erzeugte elliptisch polarisierte Licht wird teilweise vom Analysator hindurchgelassen

Bild 6.50. Optisches Schema zum Bild 49
1 Polarisator; *2* Aperturblende; *3* Kondensor; *4* und *7* Kalkspatplatten; *5* $\lambda/2$-Platte; *6* Objektebene; *8* Objektiv; *9* Meßkompensator; *10* Analysator

Polarisationsmikroskop zu einem vollständigen Interferenzmikroskop. Zur Durchführung genauer Gangunterschiedsmessungen werden zwischen Objektiv *8* und Analysator *10* noch die schon erwähnten polarisationsoptischen Meßkompensatoren *9* oder eine $\lambda/4$-Platte eingeschoben.

Zur Erläuterung des Arbeitsprinzips setzen wir zunächst monochromatisches Licht voraus, das in die erste Kalkspatplatte *4* senkrecht einfällt, und drehen den Analysator *10* so, daß seine Schwingungsrichtung auf der des Polarisators *1* senkrecht steht (gekreuzte Polare). Dann muß bei einwandfreier Justierung, spannungsfreier Optik und homogener Objektebene das Bildfeld dunkel erscheinen.

Befindet sich jedoch ein isotropes Phasenobjekt in der Objektebene, dann tritt für diesen Objektbereich kein linear, sondern elliptisch polarisiertes Licht in den Analysator ein, das (Bild 6.51) teilweise von diesem hindurchgelassen wird. Die hindurchgelassene Intensität entspricht dem Quadrat der kleinen Halbachse b der im Bild 6.51 gezeichneten Schwingungsellipse.

Sie entspricht einer Objektphasendrehung von etwa 30°. Diese Phasendrehung wird durch einen polarisationsoptischen Meßkompensator rückgängig gemacht, so daß wieder senkrecht zur Analysatordurchlaßrichtung schwingendes linear polarisiertes Licht entsteht, das Objekt also maximal dunkel erscheint. Die Stellung des Meßkompensators gibt damit bei kleinen Gangunterschieden direkt die Phasendrehung des isotropen Objekts an. Bei großen Gangunterschieden ($> \lambda/2$) muß, wie bei jedem anderen Interferenzverfahren, zunächst im weißen Licht die Interferenzordnung bestimmt werden, worauf im Abschn. 6.1.3.4. noch genauer eingegangen wird.

Genaue Gangunterschiedsmessungen sollen nur im monochromatischen Licht bei geringer Beleuchtungsapertur durchgeführt werden.

Die Interferenzanordnung nach *Jamin-Lebedeff* ist vorwiegend für das Arbeiten im Interferenzkontrast gedacht. Zum Erzeugen von Interferenzstreifen im Feld kann in der Nähe der Zwischenbildebene zusätzlich ein Quarzkeil eingeschoben werden, der die ordentliche und die außerordentliche Welle unterschiedlich neigt (virtuelle Pupillenverdoppelung), wodurch Interferenzstreifen im Feld entstehen. Die Abstände der Interferenzstreifen sind durch den Keilwinkel des Quarzkeils eindeutig festgelegt.

Interferenzokular nach *Françon* [143]

Die Interferenzanordnung nach *Françon* verwendet das gleiche Prinzip der Strahlentrennung und Bildaufspaltung wie *Jamin-Lebedeff*. Der wesentliche Unterschied besteht in der Anordnung der Kristallplatten in der Nähe der Zwischenbildebene, so daß sie sich in einem speziellen Okular unterbringen lassen. Damit läßt sich ein normales Hellfeldmikroskop einfach in ein Interferenzmikroskop verwandeln. Doch ist diese Anordnung nur für differentielle Aufspaltung zum Erzeugen eines Reliefkontrastes brauchbar.

Es wird zur Strahlentrennung eine sog. Savartsche Doppelplatte verwendet. Sie besteht aus einer Kombination zweier gleich dicker und gleich orientierter Kristallplatten, die denen nach *Jamin-Lebedeff* völlig entsprechen. Eine von ihnen ist jedoch um 90° um die optische Achse des Mikroskops gedreht, damit beide Strahlen einmal ordentlicher und einmal außerordentlicher Strahl sind. Es entfällt dann die Notwendigkeit der $\lambda/2$-Platte.

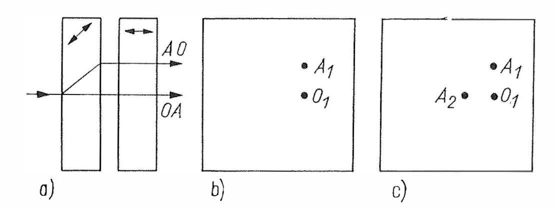


Bild 6.52. Zur Wirkung der Savartschen Doppelplatte

Im Bild 6.52 ist a) die Seitenansicht beider Platten, b) die der Lichtrichtung entgegengesetzte Draufsicht der ersten, c) die der zweiten Platte. Die optische Kristallachse in a) ragt um 45° aus der Zeichenebene heraus.

Beide Strahlen haben den gleichen optischen Weg zurückgelegt. Jedes der beiden Teilbündel ist um die gleiche Strecke $O_1 A_1 = O_1 A_2$ lateral verschoben worden. Ihr Abstand in der Zwischenbildebene ist $A_1 A_2 = \sqrt{2}\, O_1 A_1$.

Beim Interferenzmikroskop nach *Jamin-Lebedeff* ist das seitlich verschobene Bild stark astigmatisch, weil die abbildenden, außerordentlichen Strahlen in der zweiten Platte schräg durch diese hindurchgehen. Bei der Savartschen Doppelplatte gilt das prinzipiell für beide Bilder, weil für jedes die abbildenden Strahlen in einer Platte als außerordentliche Strahlen wirken. Da aber alle Strahlen mit geringer Neigung durch die Doppelplatte gehen, ist der Astigmatismus so klein, daß er die Bildqualität nicht beeinträchtigt. *Françon* hat das genauer begründet [144].

Interferenzmikroskop nach *Smith* und *Nomarski* [162] [163] [181] [182]

Bei den nach dem Shearing-Verfahren arbeitenden Interferenzanordnungen von *Jamin-Lebedeff* und *Françon* wird die laterale Bildversetzung durch Einschaltung von planparallelen Kristallplatten in

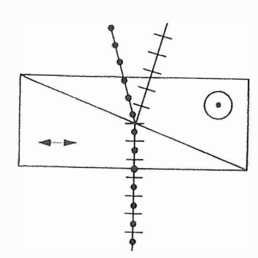


Bild 6.53. Wollastonprisma

der Nähe der Objekt- oder Zwischenbildebene verwirklicht. Ordentlicher und außerordentlicher Strahl passieren, um die Aufspaltungsgröße parallel versetzt, die Objekt- bzw. Zwischenbildebene. Beide Strahlen gehen zueinander geneigt durch die Brennebene eines nachfolgenden Linsensystems, z.B. des Objektivs. Der Neigungswinkel wird durch den Betrag der Parallelverschiebung bestimmt; d.h. andererseits, die entsprechende laterale Bildversetzung in der Bildebene läßt sich auch erreichen, wenn man in der Brennebene des Objektivs ein optisches Element anordnet, das eine Richtungsaufspaltung der ankommenden Strahlen bewirkt. Dieses Prinzip ist zuerst von *Smith* [181] für die Interferenzmikroskopie verwendet worden. Er benutzte hierfür das im Bild 6.53 dargestellte Wollastonprisma, das aus zwei unter einem rechten Winkel zueinander orientiert verkitteten Kristallprismen besteht.

Im Bild 6.54 wird das optische Schema mit Kompensationsprisma im Beleuchtungsstrahlengang gezeigt. Letzteres ist für das Grundprinzip zwar nicht unbedingt erforderlich, doch für die praktische Durchführung notwendig, weil sonst die Beleuchtungsapertur zu stark eingeschränkt werden muß. Das Prisma dient dazu, den mit dem Einfallswinkel sich ändernden Gangunterschied zwischen dem im Wollastonprisma verlaufenden ordentlichen und außerordentlichen Strahl zu kompensieren. Polarisator *1* und Analysator *7* sind unter 45° zu den optischen Achsen der Wollastonprismen *2* und *6* orientiert, so daß das in *2* einfallende linear polarisierte Licht zu gleichen Teilen in die ordentliche und außerordentliche Komponente aufgespaltet wird, die an der Kittfläche in verschiedene Richtungen abgelenkt werden. Schneiden sich die rückwärtigen Verlängerungen der *2* verlassenden aufgespalteten Strahlen in der Kondensorbrennebene, dann passieren sie, wie bei *Jamin-Lebedeff*, parallel zueinander versetzt bei O_1 und O_2 die Objektebene und werden in der Kittfläche des in der hinteren Objektivbrennebene gelegenen Wollastonprismas *6* wieder vereinigt. Jedes von der Kondensorbrennebene divergierende Strahlenbündel durchsetzt als Parallelbündel die Objektebene *4*. Da jedes Parallelbündel einer ebenen Welle entspricht, heißt das, daß die ordentliche und außerordentliche Welle in der Objektebene und damit auch in der Bildebene einander parallel sind, das Interferenzbild also keine Streifen zeigt (Interferenzkontrast). Liegen *2* und *6* aber nicht in der Brennebene, dann sind die beiden Wellenfronten zueinander geneigt, und es erscheinen im Bild Interferenzstreifen, die für genaue Messungen, besonders an kleinen Objekten, sowie für Interferenzkontrast unerwünscht sind.

Die Einstellung des günstigsten Bildkontrasts erfolgt durch seitliches Verschieben des Wollastonprismas *6*, weil sich hierdurch die optischen Wege des ordentlichen und außerordentlichen Strahls relativ zueinander ändern.

Bei starken Objektiven liegt die hintere Brennebene im Linsensystem, ist also nicht zugänglich,

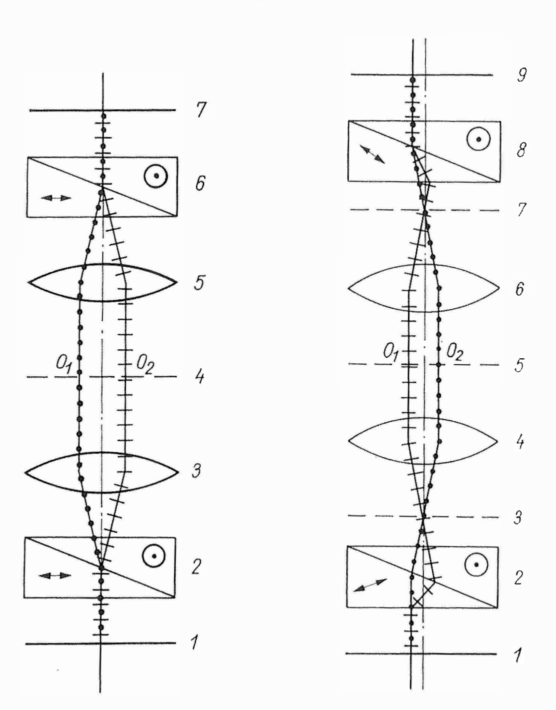


Bild 6.54. Optisches Schema des Interferenzmikroskops nach Smith

1 Polarisator; *2* und *6* Wollastonprismen; *3* Kondensor; *4* Objektebene; *5* Objektiv; *7* Analysator

Bild 6.55. Optisches Schema des Interferenzmikroskops nach Nomarski

1 Polarisator; *2* und *8* Wollastonprismen; *3* Kondensorbrennebene; *4* Kondensor; *5* Objektebene; *6* Objektiv; *7* Objektivbrennebene; *9* Analysator

so daß mit den nach Bild 6.54 orientierten Wollastonprismen die Einstellung auf Interferenzkontrast ohne Interferenzstreifen nicht möglich ist. *Nomarski* [162] hat diese Schwierigkeit (Bild 6.55) durch andere Orientierung der Einzelprismen von *2* und *6* umgangen. Beim ersten Prisma von *2* und *6* liegt die kristalloptische Achse nicht mehr parallel zur Grundfläche. Die Aufspaltung und Wiedervereinigung des ordentlichen und außerordentlichen Strahls erfolgen jetzt nicht mehr in der Trennfläche der Einzelprismen. Man kann Orientierung, Prismenwinkel und Dicke, auch bei relativ großer Ablage von der Brennebene, so wählen, daß die Aufspaltung bzw. Wiedervereinigung virtuell in der Brennebene erfolgt. Das Interferenzprinzip nach *Smith* und *Nomarski* liefert nur relativ kleine Bildaufspaltungen, so daß es im wesentlichen für differentiellen Interferenzkontrast und nur in Ausnahmefällen für Gangunterschiedsmessungen verwendet wird.

Solche interferenzmikroskopischen Einrichtungen werden u. a. von Reichert (Wien), Leitz (Wetzlar), Opton (Oberkochen) und dem VEB Carl Zeiss JENA angeboten. Sie sind als Zusatzeinrichtungen für normale Mikroskope ausgeführt. Erforderlich sind neben Polarisator und drehbarem Analysator ein an geeigneter Stelle angeordneter Schieber mit den Wollastonprismen, von denen mindestens eines justierbar sein muß und die für die verschiedenen Objektive aufeinander abgestimmt sind. Meist beläßt man bei Objektivwechsel das abbildungsseitige Prisma und tauscht das beleuchtungsseitige gegen ein anderes aus. Es ist zweckmäßig, letzteres auf einem drehbaren Revolver anzuordnen.

Interferenzmikroskop nach *Pluta* [168] [169]

Eine interessante Abwandlung des Interferenzmikroskops nach *Nomarski* ist im Jahre 1962 von *Pluta* beschrieben worden. Das optische Prinzipschema wird im Bild 6.56 gezeigt. Der wesentliche Unterschied gegenüber *Nomarski* besteht darin, daß das im Abbildungsstrahlengang angeordnete Wollastonprisma durch zwei hintereinandergeschaltete *7* und *8* ersetzt worden ist. Das eine *8* wird in einen Zwischentubus eingeschoben, während das andere *7* direkt mit dem Objektiv verbunden und auf dieses abgestimmt ist. Für jedes Objektiv ist also ein spezielles Wollastonprisma erforderlich. Letzteres ist um 180° drehbar und kann so in Additions- und Subtraktionsstellung zu *8* gebracht werden. In der Abbildung ist die Additionsstellung dargestellt. Bei Drehung um 45° aus der Additionsstellung stimmt die optische Kristallachse mit der Schwingungsrichtung des Polarisators überein, so daß in diesem Fall im ersten Wollastonprisma keine Aufspaltung erfolgt (Neutralstellung), also die Anordnung so wirkt, wie wenn dieses Prisma nicht vorhanden ist. Durch Drehung um 45 oder 180° sind somit bei gleicher Prismenkombination drei verschiedene Beträge der Bildaufspaltung einstellbar. Die erreichbare maximale Bildaufspaltung ist mit etwa 1/20 des Sehfelds immer noch recht klein. Das Prisma *8* ist in Richtung und senkrecht zur optischen Achse verstellbar; in Richtung der Achse, um ein homogenes Feld einstellen zu können, und senkrecht dazu zum Messen der von den Objekten hervorgerufenen Gangunterschiede. Durch Auswechseln des Prismas *8* gegen solche mit anderen Prismenwinkeln ist die Einstellung differentieller und totaler Bildaufspaltung mit und ohne Interferenzstreifen möglich.

Die Verwendung eines Kondensors mit Kompensationsprisma zur Vergrößerung der nutzbaren Beleuchtungsapertur wird nur für qualitative Untersuchungen empfohlen, weil sich für exakte Messungen der bekannte Aperturfehler bemerk-

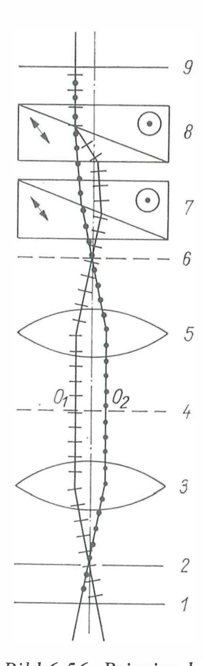


Bild 6.56. Prinzipschema des Interferenzmikroskops nach Pluta

1 Polarisator; 2 Aperturblende; 3 Kondensor; 4 Objektebene; 5 Objektive; 6 Objektivbrennebene; 7 und 8 Wollastonprismen; 9 Analysator

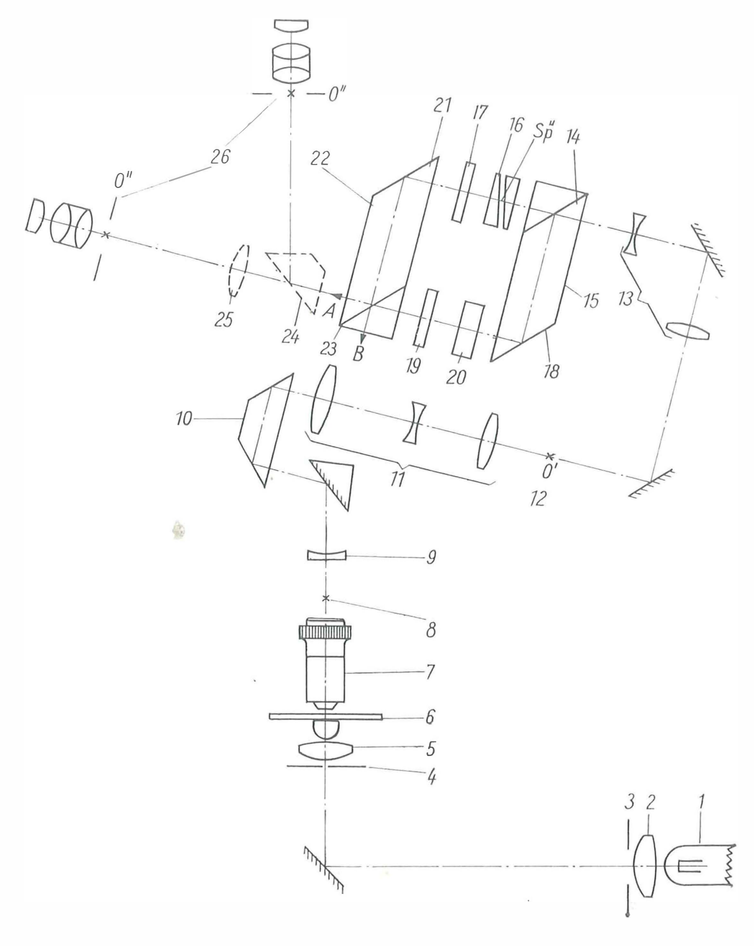


Bild 6.57
Optisches Schema des Interphako-Mikroskops (Shearingverfahren) von Bild 6.58
1 Lichtquelle; *2* Kollektor; *3* Leuchtfeldblende; *4* Beleuchtungsspalt; *5* Kondensor; *6* Objektebene; *7* Objektiv; *8* 1. Spaltbild; *9* Tubuslinse; *10* Schiebeprisma; *11* und *13* Zwischenabbildungssystem; *12* 1. Zwischenbild; *14* und *23* Teilungsflächen; *15* und *22* Interferometerprismen; *16* Drehkeil; *17* Phasenschieber; *18* und *21* Umlenkspiegel; *19* und *20* Kompensationskeile; *24* Umlenkprisma; *25* Bertrand-Linse; *26* Okularbildebene

bar macht [155] [156]. Im anderen Fall wäre natürlich für jede Stellung von *7* und für jedes Objektiv ein spezielles Kompensationsprisma erforderlich.

Interferenzmikroskop „Interphako“ nach *Beyer-Schöppe* [132] [135] [136]

Die bisher beschriebenen interferenzmikroskopischen Anordnungen mit Beeinflussung des Vergleichsstrahlengangs durch das Objekt arbeiten ausschließlich im polarisierten Licht. Der VEB Carl Zeiss JENA hat in den letzten Jahren ein neues Interferenzmikroskop entwickelt, das auch in diese Kategorie gehört, aber kein polarisiertes Licht benötigt. Es arbeitet mit einem kleinen Mach-Zehnder-Interferometer im Abbildungsstrahlengang und ist sowohl für Durchlicht als auch für Auflicht anwendbar. Es wird nach dem Shearing-Verfahren oder dem vom Phasenkontrast abgeleiteten Interphakoverfahren gearbeitet. Das Grundprinzip sei zunächst an dem optischen Schema für das Shearing-Verfahren (Bild 6.57) erläutert.

Die Lichtquelle *1* wird nach den Regeln des Köhlerschen Beleuchtungsprinzips mit der Kollektorlinse *2* in den in der vorderen Kondensorbrennebene gelegenen Beleuchtungsspalt *4* und die Leuchtfeldblende *3* mit dem Kondensor *5* in die Objektebene *6* abgebildet. Kondensor *5* und Objektiv *7* erzeugen ein erstes Bild des Beleuchtungsspalts in der Objektivaustrittspupille bei *8* und mit einem speziell für diesen Zweck korrigierten, aus den Linsengruppen *11* und *13* bestehenden Zwischenabbildungssystem ein zweites Bild des Spalts innerhalb des aus den verkitteten Prismen *15* und *22* bestehenden Interferometers. Das vom Objektiv erzeugte Bild wird über das Schiebeprisma *10* und den ersten Teil des Zwischenabbildungssystems in die erste Zwischenbildebene *12* und schließlich durch den zweiten Teil des Zwischenabbildungssystems über das Interferometer in die Okularbildebene nach *26*

gebracht. Das Zwischenabbildungssystem ist notwendig, weil sich für ein einwandfreies Funktionieren des Verfahrens ein Bild des Spalts *4* innerhalb des Interferometers befinden muß, und besonders bei starken Objektiven die Austrittspupille, in der das 1. Spaltbild entsteht, innerhalb des Linsensystems liegt. Durch das Schiebeprisma *10* wird außerdem der Unterschied in der Lage der Austrittspupillen bei den verschiedenen Objektiven ausgeglichen, so daß das zweite Spaltbild immer exakt in die gleiche Ebene gelegt werden kann. Die Zwischenbildlagen *12* und *26* ändern sich dabei nicht, weil im Bereich des Schiebeprismas von gleichen Objektpunkten ausgegangene Strahlen parallel verlaufen. In der halbdurchlässigen Kittfläche *14* des ersten Interferometerprismas *15* werden die Strahlen aufgespaltet und gelangen über die Umlenkspiegel *18* und *21* zu der im zweiten Interferometerprisma *22* gelegenen halbdurchlässigen Kittfläche *23*, in der sie wieder vereinigt werden. In der Zwischenbildebene *26* entsteht schließlich ein Interferenzbild, das mit den im Interferometer befindlichen optischen Elementen in verschiedener Weise modifiziert werden kann.

Am Ort des Spaltbilds ist ein gegen eine Ringblende auswechselbarer Drehkeil *16* angeordnet. Er besteht aus zwei übereinanderliegenden schwachen Glaskeilen, die so gegeneinander drehbar sind, daß die Ablenkung bei Erhaltung der Ablenkungsrichtung von Null bis zur doppelten Ablenkung des Einzelkeils variiert werden kann. Daraus resultieren (vgl. Bilder 6.39 bis 6.41) zwei seitlich gegeneinander verschobene Teilbilder, die den durch ein in der Objektebene befindliches Phasenobjekt deformierten Wellenflächen entsprechen. Die Bildaufspaltung kann stets den speziellen Objekteigenschaften angepaßt werden. Es läßt sich also mit der gleichen Anordnung sowohl die totale als auch die differentielle Bildaufspaltung durchführen. Da die entsprechenden Wellenfronten zueinander kohärent sind, können die Phasenobjekte durch Interferenz kontrastreich dargestellt werden. Zum Messen von Gangunterschieden wird der Kontrast durch den Phasenschieber, einen schwachen Glaskeil *17*, variiert. Stellt man nacheinander Objekt und Umgebung auf größte Dunkelheit oder im weißen Licht auf eine bestimmte Farbe ein, so läßt sich aus den Stellungen des Phasenschiebers der durch das Objekt hervorgerufene Gangunterschied ermitteln. Die Kompensationskeile *19* und *20* dienen zur Kompensation des Glaswegs von *16* und *17*, weil andernfalls kein homogenes Interferenzfeld zu erreichen ist. Da sie um senkrecht zueinander und senkrecht auf der optischen Achse stehende Achsen drehbar angeordnet sind, erreicht man damit eine in Betrag und Richtung veränderliche virtuelle Pupillenaufspaltung und, da die beiden Pupillenbilder kohärenten Lichtquellen entsprechen, in Abstand und Richtung veränderliche Interferenzstreifen in der Zwischenbildebene *26*. Durch Auseinanderziehen der Interferenzstreifen läßt sich das gesamte Bildfeld auf eine gleichmäßige Farbe oder Helligkeit einstellen und damit der sog. Interferenzkontrast verwirklichen.

Bei relativ großen Bildaufspaltungen muß zur Sicherung eines guten Kontrastes die Beleuchtungsapertur in Aufspaltungsrichtung stark eingeschränkt werden. Deshalb ist der Beleuchtungsspalt als verstellbarer Präzisionsspalt ausgeführt. Die Spaltbreite soll der Bedingung

$$\frac{bB}{f} < \frac{\lambda}{4}$$

genügen.

b	Spaltbreite,
$B = \overline{O_1 O_2}$	auf die Objektebene bezogene Größe der Bildaufspaltung,
f	Kondensorbrennweite,
λ	Lichtwellenlänge.

Die Interferenzen werden aber nicht gestört, wenn man mehrere, danach dimensionierte Beleuchtungsspalte zuläßt, deren Abstände d die Bedingung $dB/f = \lambda$ erfüllen.

Im monochromatischen Licht ist es also möglich, statt eines Beleuchtungsspalts ein Beleuchtungsgitter geeigneter Gitterkonstante zu verwenden, weil die Größe der Bildaufspaltung der Gitterkonstante des Beleuchtungsgitters genau angepaßt werden kann. Bei Verwendung von n Gitterstrichen kann die durch den zu engen Beleuchtungsspalt geminderte Bildqualität wesentlich verbessert und die Bildintensität auf das n-fache gesteigert werden. Das ist für die Praxis von außerordentlicher Bedeutung.

Im Bild 6.58 ist das Interferenzmikroskop „PERAVAL interphako" in der Ausrüstung für das Shearingverfahren mit Beleuchtungsspalt im Kondensor und Drehkeil im Interferometer dargestellt.

Ein weiteres mit dem gleichen Gerät durchzuführendes Interferenzverfahren ist das sog. „Interphakoverfahren", das seinen Namen der engen Verwandtschaft mit dem Phasenkontrastverfahren verdankt. Es ist besonders für Gangunterschiedsmessungen an kleinsten Phasenobjekten

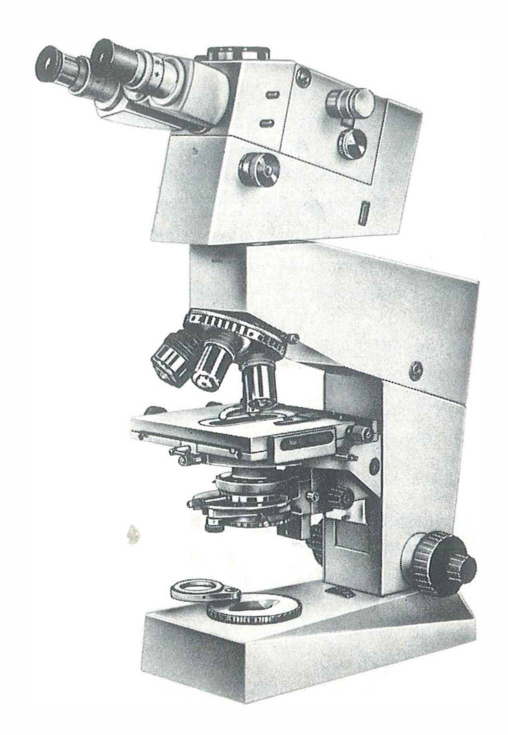


Bild 6.58. Interferenzmikroskop PERAVAL interphako, ausgerüstet für Shearingverfahren
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

bis zur Auflösungsgrenze geeignet. Seine Überlegenheit besteht vor allem in der aus der rotationssymmetrischen Beleuchtung resultierenden ausgezeichneten Bildqualität und dem für jedes einzelne Objekt einstellbaren optimalen Kontrast sowie in der Tatsache, daß keine Doppelbilder auftreten. Man kann es direkt als ein quantitatives Phasenkontrastverfahren bezeichnen. Das Grundprinzip besteht darin, daß im Vergleichsstrahlengang das am Objekt gebeugte Licht zurückgehalten und nur das direkte Licht hindurchgelassen wird. Da nach der Abbeschen Theorie von der Bildentstehung im Mikroskop das direkte Licht allein keinerlei Strukturen vermitteln kann, ist die Vergleichswelle im Idealfall eine ebene Welle (vgl. Bild 6.38).

Für den Übergang vom Shearing- zum Interphakoverfahren ist es lediglich erforderlich, im Bild 6.57 Spalt *4* und Drehkeil *16* durch zwei zueinander konjugierte Ringblenden zu ersetzen, wobei die an die Stelle von *4* getretene Ringblende genau der für Phasenkontrast entspricht. Das über *14-18-23* geleitete Teilbündel vermittelt eine, im Rahmen der durch das abbildende System gegebenen Möglichkeiten, vollständige Abbildung der Objektstrukturen. Die an die Stelle des Drehkeils getretene Ringblende hält das an den Objektstrukturen gebeugte Licht zurück, um so vollkommener, je feiner diese sind und je kleiner die Breite der Ringblende ist. Deshalb werden zwei konzentrische Blendenringe unterschiedlicher Breite benutzt, von denen der breitere beleuchtungsseitig wahlweise abgedeckt werden kann. Das über *14-21-23* geleitete direkte Licht liefert somit im Zwischenbild *26* einen zu den Objektstrukturen kohärenten Untergrund, der in seiner Wirkung einer ebenen Vergleichswelle entspricht. Mit dem Phasenschieber können, ähnlich wie beim Shearing-Verfahren, genaue Gangunterschiedsmessungen durchgeführt werden.

Zur bequemeren Durchführung von Gangunterschiedsmessungen und zur Verbesserung der Meßgenauigkeit ist eine am Ort des ersten Zwischenbilds bei O' einsetzbare Halbschattenplatte (Bild 6.59) vorgesehen. Sie stellt für das Shearingverfahren im wesentlichen eine Phasenstufe a) und für das Interphakoverfahren einen Phasenstreifen geeigneter Breite dar. Das Grundprinzip für Gangunterschiedsmessungen mit der Halbschattenplatte wird unter b) und c) gezeigt. Die Kante der Phasenstufe bzw. des Phasenstreifens wird quer durch das Zwischenbild des zu vermessenden Objekts gelegt. Sie teilt Objekt und Umgebung in zwei Bereiche unterschiedlicher Helligkeit. Als Einstellkriterium dient der nacheinander durchgeführte Helligkeitsabgleich im Objekt und in der Umgebung.

Zur besseren und zielstrebigen Justierung kann zur Pupillenbeobachtung die im Bild 6.57 gestrichelt gezeichnete Bertrand-Linse *25* und zur Mikrofotografie das Prisma *24* eingeschaltet werden. Letzteres lenkt den Strahlengang nach oben, wo eine mikrofotografische Einrichtung ansetzbar ist. Nachzutragen ist an dieser Stelle noch eine Bemerkung zur Durchführung des schon im Abschn. 6.1.2.5. beschriebenen universellen Phasenkontrastes.

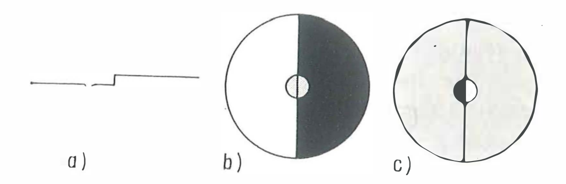


Bild 6.59. Zur Wirkung der Halbschattenplatte
a) Beispiel für die Form einer Halbschattenplatte;
b) Abgleich im Objekt;
c) Abgleich in der Umgebung

Um aus dem Interferenzmikroskop ein universelles Phasenkontrastmikroskop nach Bild 6.22 zu machen, wird lediglich der Interferenzeinsatz durch einen Einsatz ersetzt, der einen Revolver für die zu verwendenden Phasenringe trägt. Es wird also mit normalen Hellfeldobjektiven gearbeitet. Der Ringblendenrevolver am Kondensor bleibt dabei derselbe und muß, wegen der Ringblendengröße, lediglich dann ausgetauscht werden, wenn Objektive anderer Maßstabszahlen verwendet werden sollen.

6.1.3.4. Anwendungen

Biologie und Medizin

Neben solchen qualitativen Untersuchungsverfahren zur Bestimmung der Gestalt und der Größenverteilung mikroskopischer Objekte, wie biologische Zellen und Zellkomponenten, ist besonders in den letzten zwei Jahrzehnten das Interesse an der quantitativen Bestimmung des Zellinhalts immer mehr angestiegen. Erhofft man sich doch aus diesen Bestimmungen wichtige Rückschlüsse auf die Funktion der gesunden und kranken Zelle und ihre wesentlichen Unterscheidungsmerkmale zu erhalten, um damit z.B. eine Früherkennung des Krebses zu ermöglichen. Wenn dieses Ziel auch noch nicht erreicht werden konnte, so ist man doch aufgrund der intensiven Arbeiten in den über die ganze Welt verbreiteten Forschungsinstitutionen schon ein gutes Stück vorangekommen. Die Interferenzmikroskopie hat sich auf diesem Gebiet, seit der wesentlichen Verbesserung des Interferenzmikroskops, z.B. zur Bestimmung der Trockenmasse im Zellkern, aber auch für Schnittdickenbestimmungen, einen wichtigen Platz erobert, worauf jetzt etwas genauer eingegangen werden soll.
Gemessen werden immer Gangunterschiede, d.h. das Produkt aus Dicke d und Brechzahldifferenz Δn. Um beide Größen getrennt zu ermitteln, sind stets zwei voneinander unabhängige Messungen erforderlich. Einige Grundlagen dafür sind Anfang der fünfziger Jahre ausgearbeitet worden [127] bis [130] [137] bis [139] [161] [164]. Wichtigste zu messende Größe für die Bestimmung der Trockenmasse in einer Zelle ist die Brechzahl, weil sich diese nach einer einfachen Beziehung mit der gelösten Trockenmasse, die im wesentlichen aus Eiweiß und Nukleinsäuren besteht, ändert. Es ist

$$n = n_W + \alpha C \quad \text{oder} \quad C = \frac{n - n_W}{\alpha}. \tag{6.9}$$

n und n_W sind die Brechzahlen von Lösung und Lösungsmittel. Letzteres ist bei biologischen Zellen im allgemeinen Wasser. Das spezifische Brechungsinkrement α ist die Zunahme von n für 1% Zunahme der Konzentration an Trockenmasse und liegt für Proteine bei 0,18 bis 0,19 in cm^3/g. Die Konzentration der Trockenmasse ist C in Gramm je 100 cm^3. Der durch das zu untersuchende Objekt relativ zur Umgebung hervorgerufene Gangunterschied Δ ist gegeben durch

$$\Delta = (n - n_E)\, d;$$

d Objektdicke,
n_E Brechzahl des Einschlußmittels,
und da nach Gl.(6.9) $n = n_W + \alpha C$ ist, wird

$$\Delta = (n_W - n_E + \alpha C)\, d. \tag{6.10}$$

Bei bekannter Dicke und bekanntem Brechungsinkrement läßt sich daraus die Konzentration der Trockenmasse bestimmen:

$$C = \frac{\Delta - (n_W - n_E)\, d}{\alpha d} \tag{6.11}$$

oder für die Trockenmasse je Fläche

$$\frac{M}{A} = Cd = \frac{n - n_W}{\alpha}\, d = \frac{\Delta - (n_W - n_E)\, \mathrm{d}}{\alpha}. \tag{6.12}$$

Ist die Zelle in Wasser oder eine Salzlösung eingebettet, deren Brechzahl sich innerhalb der Meßgenauigkeit nicht von der des Wassers unterscheidet, dann vereinfachen sich die Gln.(6.10) bis (6.12), und es wird

$$\Delta = \alpha C d \tag{6.10a}$$

$$C = \frac{\Delta}{\alpha d} \tag{6.11a}$$

$$\frac{M}{A} = \frac{\Delta}{\alpha}. \tag{6.12a}$$

Um die gesamte Trockenmasse einer flachen Zelle oder eines Zellelements zu erhalten, ist M/A mit der von der Zelle eingenommenen Fläche zu multiplizieren. Die Bestimmung ist, je nach verlangter Genauigkeit, mit mehr oder weniger großem Aufwand möglich. Bei einer lebenden, sich verändernden Zelle darf man jedoch die Erwartungen hinsichtlich Meßgenauigkeit nicht zu hoch ansetzen. Oft wird es genügen, die Dicke abzuschätzen, oder sie kann aufgrund anderer Untersuchungen mit ausreichender Genauigkeit als bekannt vorausgesetzt werden. Ist das jedoch nicht der Fall, dann läßt sie sich durch zwei Messungen bestimmen,

wenn das Untersuchungsobjekt nacheinander in zwei Flüssigkeiten unterschiedlicher, aber bekannter Brechzahl eingebettet werden kann. Wir erhalten dann nach Gl. (6.10) zwei Gleichungen

$$\Delta_1 = (n_W - n_{E1} + \alpha C)\, d, \quad \Delta_2 = (n_W - n_{E2} + \alpha C)\, d \tag{6.13}$$

und daraus

$$d = \frac{\Delta_1 - \Delta_2}{n_{E2} - n_{E1}}. \tag{6.14}$$

Durch Einsetzen des Ausdrucks für d in eine der beiden Gln. (6.13) ergibt sich für die Konzentration der Trockenmasse

$$C = \frac{\Delta_1(n_{E2} - n_W) - \Delta_2(n_{E1} - n_W)}{\alpha(\Delta_1 - \Delta_2)}. \tag{6.15}$$

Am Kompensator des Interferenzmikroskops werden Δ_1 und Δ_2 abgelesen und n_{E1} und n_{E2} entweder in einem Refraktometer oder nach einem der im Abschn. 6.1.3.4. beschriebenen Verfahren interferenzmikroskopisch gemessen. Bei nichtflachen Objekten ist noch ein Formfaktor zu berücksichtigen.

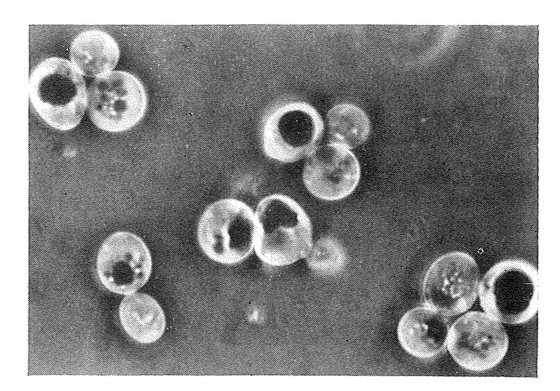
Diese Methode ist nur anwendbar, wenn das Einbettungsmittel folgende Bedingungen erfüllt:

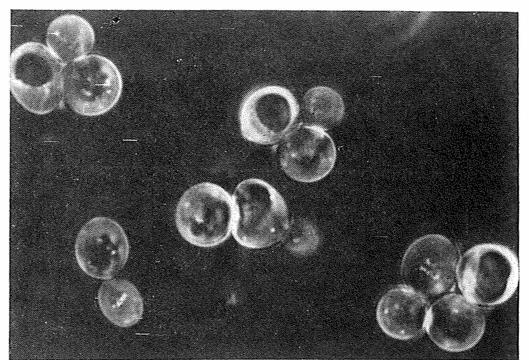
Es darf nicht in die Zelle eindringen, muß einen niedrigen osmotischen Druck haben, darf bei Untersuchung lebender Zellen nicht giftig sein und die Struktur und die Funktion der lebenden Zelle nicht beeinflussen. Diese Bedingungen werden von Albumin erfüllt, das in sehr unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser löslich ist.

Hager und *Pehland* [152] haben vorgeschlagen, statt der Variation der Konzentration des Einbettungsmittels die Lichtwellenlänge bei unverändertem Einbettungsmittel zu variieren und mit einer Zweiwellenlängenmethode zu arbeiten. Es werden dabei die Brechzahlen für die beiden benutzten Wellenlängen verwendet.

Jedoch wird schon von den Autoren einschränkend bemerkt, daß dafür eine wesentliche Steigerung der Meßgenauigkeit erforderlich ist; denn in diesem Fall sind die Brechzahlunterschiede sehr gering, so daß schon relativ kleine Meßfehler das Ergebnis stark beeinflussen.

Nach einer anderen, von *Davies* [137] angegebenen Methode zur Bestimmung von Dicke und Brechzahl einer Zelle wird in das umgebende Einschlußmittel künstlich eine Luftblase eingebracht und die Zelle etwas zusammengedrückt, so daß die Luftblase die gleiche Dicke wie die Zelle hat. Die Messung des Gangunterschieds an der Luftblase ergibt bei bekannter Brechzahl des Ein-





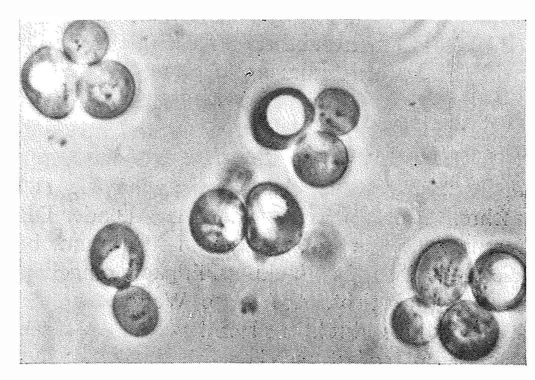


Bild 6.60. Lebende Bäckerhefe im Interferenzkontrast
Es wurden nacheinander, von oben nach unten auf größte Dunkelheit der Vakuolen, der Umgebung und der Granula eingestellt

bettungsmittels die Dicke und eine zweite Messung an der Zelle deren Brechzahl, d.h.,

$$\Delta_1 = (n_E - 1)\, d$$

$$\text{gibt} \quad d = \frac{\Delta_1}{n_E - 1}, \tag{6.16a}$$

$$\Delta_2 = (n - n_E) d$$

$$\text{gibt} \quad n = \frac{\Delta_2}{d} + n_E = \frac{\Delta_2}{\Delta_1}(n_E - 1) + n_E. \tag{6.16b}$$

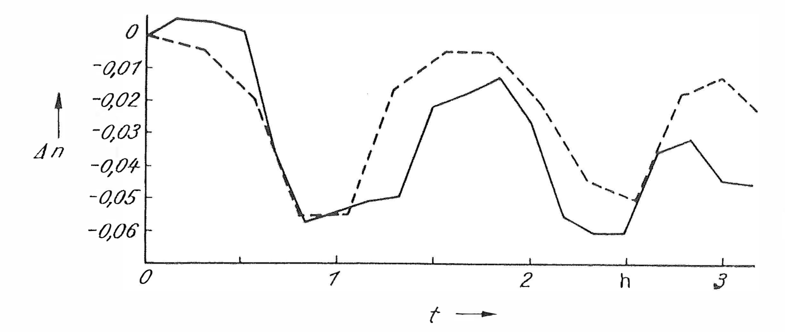


Bild 6.61
Zeitlicher Brechzahlverlauf bei lebender Bäckerhefe nach Bild 6.60

Weitere Einzelheiten über die Methodik und die damit erhaltenen Ergebnisse können u.a., außer in den schon genannten Arbeiten, in [135] [153] [167] nachgelesen werden. Spezielle Arbeiten zur Trockenmassebestimmung in Biologie und Medizin, auf die aber in diesem Rahmen nicht genauer eingegangen werden kann, sind [148] [149] [151] [154] [165] [166] [171] [172] [176]. Diese interferenzmikroskopischen Trockenmassebestimmungen können sowohl an fixierten histologischen Schnitten als auch an lebenden Zellen durchgeführt werden.

Eigene Untersuchungen an lebenden Hefezellen (Bild 6.60) zeigen in der Wachstumsphase (Bild 6.61) einen deutlichen Anstieg der Brechzahl, bis das Maximum erreicht ist. Hier setzt die Sprossung ein. Die Brechzahl geht danach bis zu einem Minimum zurück, um dann bei der nächsten Wachstumsphase wieder bis zur Sprossung anzusteigen. Dieser Vorgang wiederholt sich mehrere Male, allerdings mit abnehmender Differenz zwischen Maximum und Minimum, bis die Zelle ihre Entwicklungsfähigkeit eingebüßt hat und abstirbt. Auf diese Weise kann der Lebenszyklus direkt messend verfolgt werden. Man kann sofort angeben, ob die Zelle noch entwicklungsfähig ist, und erkennt den Zeitpunkt, wann die Sprossung einsetzt.

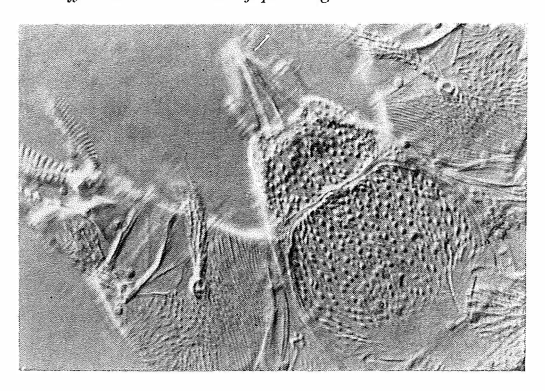
Schnittdickenbestimmungen, besonders an Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie, gewinnen immer mehr an Bedeutung, um einerseits die für die elektronenmikroskopische Abbildung optimale Schnittdicke festzustellen und zu kontrollieren und andererseits bei Serienschnitten eine eindeutige Zuordnung jedes einzelnen Schnitts zur Lage im mikroskopischen Objekt, z.B. einer Zelle, zu finden. Die Methode der Metallbedampfung und interferenzmikroskopischen Ausmessung im Auflicht, z.B. von *Bachmann* und *Sitte* [448], ist nur beschränkt anwendbar. Aussichtsreicher erscheinen die Durchlichtmethoden, bei denen der unveränderte Schnitt ausgemessen werden kann.

Schließlich sind noch die qualitativen Interferenzverfahren, z.B. das Shearingverfahren mit differentieller Bildaufspaltung, zu erwähnen, die in Sonderfällen durch den starken Reliefeffekt gegenüber dem Phasenkontrast gewisse Vorteile haben. Beispiele dafür sind in [126] [131] und [180] enthalten. Ein weiteres Beispiel gibt die mit dem Interphako-Mikroskop im differentiellen Interferenzkontrast hergestellte Aufnahme des Kopfes einer Milbe (Bild 6.62).

Anwendungen in anderen, vorwiegend technischen Arbeitsgebieten

Die Weiterentwicklung von Wissenschaft und Technik führt zu der Forderung, auch auf dem technischen Sektor in mikroskopischen Bereichen genaue Dicken- und Brechzahlmessungen an durchsichtigen Stoffen durchzuführen. Eine solche Methode zur Brechzahlbestimmung an kleinen Phasenobjekten ist die im Abschn. 6.1.2.7. beschriebene, heute vorwiegend im Phasenkontrast verwendete Immersionsmethode. In der Mineralogie ist sie ein wichtiges Mittel zur Identifizierung

Bild 6.62. Kopf einer Milbe bei differentieller Bildaufspaltung



von Substanzen. Bei der Herstellung von optischem Glas dient sie zur Qualitätskontrolle. In der Biologie ist sie zur Brechzahlbestimmung des Zellinhalts und zur Verbesserung des mikroskopischen Bilds angewendet worden. In allen Fällen muß die Brechzahl des Einschlußmittels mit einem Refraktometer bestimmt werden. Deshalb soll zunächst erläutert werden, wie man das Interferenzmikroskop selbst als Refraktometer für die Brechzahlbestimmung des Einschlußmittels und der eingebetteten Probe benutzen kann.
Man bringt in einem eben geschliffenen Objektträger aus Glas eine kleine Vertiefung an, in die die zu messende Flüssigkeit gebracht wird, und verwendet eines der beschriebenen Interferenzverfahren, entweder ohne Beeinflussung der Vergleichswelle durch das Objekt nach Bild 6.38 oder das Shearingverfahren mit totaler Bildaufspaltung nach den Bildern 6.39 und 6.40. Sind Brechzahl des Trägerglases n_{Gl} und Tiefe d der kleinen Vertiefung bekannt, dann läßt sich durch Messen des Gangunterschieds Δ die Brechzahl der Flüssigkeit n_{Fl} bestimmen.

$$n_{Fl} = n_{Gl} + \Delta/d. \tag{6.17}$$

Sind aber Tiefe d und Brechzahl n_{Gl} unbekannt, dann lassen sich beide durch zwei Messungen mit Einbettungsmitteln bekannter Brechzahl bestimmen, wobei das eine Einbettungsmittel auch Luft sein kann. Die eigentlichen Schwierigkeiten bei der Herstellung einer solchen Vertiefung sind technologischer Natur, denn sie muß ganz bestimmte Bedingungen erfüllen.

1. Die Breite der Vertiefung muß kleiner sein als das Sehfeld des verwendeten Objektivs, möglichst kleiner als die Hälfte desselben. Bei starken Objektiven ist das Sehfeld im allgemeinen kleiner als 200 μm, d.h., die Breite muß dann auf jeden Fall kleiner als 200 μm oder besser kleiner als 100 μm sein.
2. Zur Erreichung einer hohen Meßgenauigkeit darf die Vertiefung nicht zu flach sein (tiefer als 10 μm).
3. Die Oberfläche der Vertiefung muß von guter optischer Qualität sein.
4. Die eingestellten Interferenzstreifen sollen sich vom Rand bis zur Talsohle verfolgen lassen, deshalb dürfen die Flanken nicht zu steil sein, weil die Zuordnung des neutralen Streifens im weißen Licht bei großen Gangunterschieden ziemlich schwierig und nicht ganz eindeutig ist.

Die letzte Bedingung läßt sich gut von einem eingeschliffenen Kugelsegment erfüllen; die ersten beiden aber nur, wenn man sich auf schwächere Objektive beschränkt. Ein solches Mikroskoprefraktometer wird von Opton, Oberkochen, [147] angeboten. Zur Messung wird die Anzahl der im Bild 6.63 sichtbaren Interferenzringe abgezählt und der Bruchteil eines Ringabstands mit dem Kompensator gemessen.

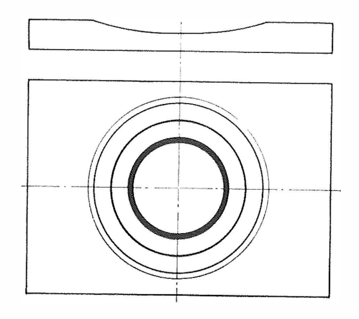


Bild 6.63. Interferenzstreifenverlauf an einem Kugelsegment



Bild 6.64. Objektträger mit gerader, trapezförmiger Nut als Mikroskoprefraktometer

Der VEB Carl Zeiss JENA liefert zum PERAVAL interphako eine Einrichtung für mikroskopische Refraktometrie, deren wichtigster Bestandteil, der Objektträger mit gerader trapezförmiger Nut, im Bild 6.64 schematischdargestellt ist [133]. Die Tiefe der Nut ist > 10 μm bei einer Breite < 30 μm,

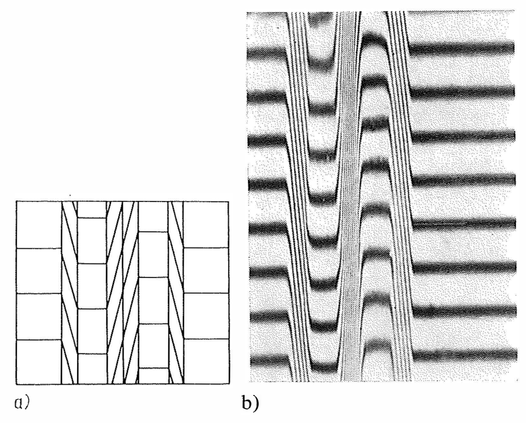


Bild 6.65. Mikroskoprefraktometer nach Bild 6.64 im Shearingverfahren bei totaler Bildaufspaltung mit Interferenzstreifen
a) schematisch;
b) im Interferenzmikroskop

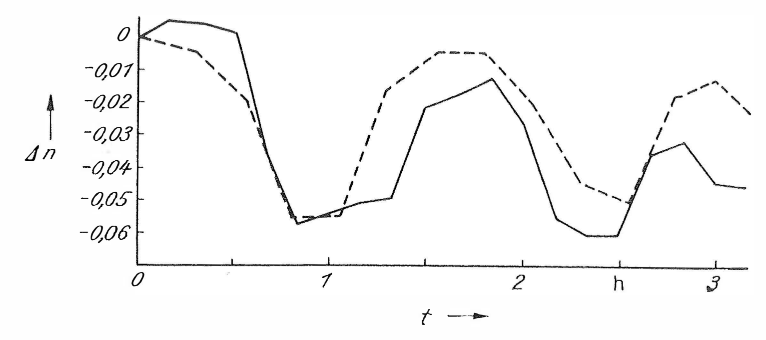


Bild 6.61
Zeitlicher Brechzahlverlauf bei lebender Bäckerhefe nach Bild 6.60

Weitere Einzelheiten über die Methodik und die damit erhaltenen Ergebnisse können u.a., außer in den schon genannten Arbeiten, in [135] [153] [167] nachgelesen werden. Spezielle Arbeiten zur Trockenmassebestimmung in Biologie und Medizin, auf die aber in diesem Rahmen nicht genauer eingegangen werden kann, sind [148] [149] [151] [154] [165] [166] [171] [172] [176]. Diese interferenzmikroskopischen Trockenmassebestimmungen können sowohl an fixierten histologischen Schnitten als auch an lebenden Zellen durchgeführt werden.

Eigene Untersuchungen an lebenden Hefezellen (Bild 6.60) zeigen in der Wachstumsphase (Bild 6.61) einen deutlichen Anstieg der Brechzahl, bis das Maximum erreicht ist. Hier setzt die Sprossung ein. Die Brechzahl geht danach bis zu einem Minimum zurück, um dann bei der nächsten Wachstumsphase wieder bis zur Sprossung anzusteigen. Dieser Vorgang wiederholt sich mehrere Male, allerdings mit abnehmender Differenz zwischen Maximum und Minimum, bis die Zelle ihre Entwicklungsfähigkeit eingebüßt hat und abstirbt. Auf diese Weise kann der Lebenszyklus direkt messend verfolgt werden. Man kann sofort angeben, ob die Zelle noch entwicklungsfähig ist, und erkennt den Zeitpunkt, wann die Sprossung einsetzt.

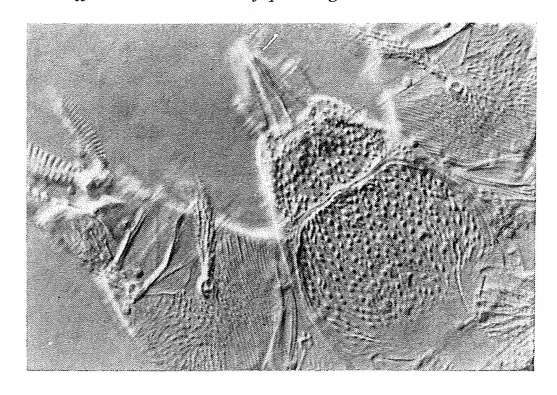
Schnittdickenbestimmungen, besonders an Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie, gewinnen immer mehr an Bedeutung, um einerseits die für die elektronenmikroskopische Abbildung optimale Schnittdicke festzustellen und zu kontrollieren und andererseits bei Serienschnitten eine eindeutige Zuordnung jedes einzelnen Schnitts zur Lage im mikroskopischen Objekt, z.B. einer Zelle, zu finden. Die Methode der Metallbedampfung und interferenzmikroskopischen Ausmessung im Auflicht, z.B. von *Bachmann* und *Sitte* [448], ist nur beschränkt anwendbar. Aussichtsreicher erscheinen die Durchlichtmethoden, bei denen der unveränderte Schnitt ausgemessen werden kann.

Schließlich sind noch die qualitativen Interferenzverfahren, z.B. das Shearingverfahren mit differentieller Bildaufspaltung, zu erwähnen, die in Sonderfällen durch den starken Reliefeffekt gegenüber dem Phasenkontrast gewisse Vorteile haben. Beispiele dafür sind in [126] [131] und [180] enthalten. Ein weiteres Beispiel gibt die mit dem Interphako-Mikroskop im differentiellen Interferenzkontrast hergestellte Aufnahme des Kopfes einer Milbe (Bild 6.62).

Anwendungen in anderen, vorwiegend technischen Arbeitsgebieten

Die Weiterentwicklung von Wissenschaft und Technik führt zu der Forderung, auch auf dem technischen Sektor in mikroskopischen Bereichen genaue Dicken- und Brechzahlmessungen an durchsichtigen Stoffen durchzuführen. Eine solche Methode zur Brechzahlbestimmung an kleinen Phasenobjekten ist die im Abschn. 6.1.2.7. beschriebene, heute vorwiegend im Phasenkontrast verwendete Immersionsmethode. In der Mineralogie ist sie ein wichtiges Mittel zur Identifizierung

Bild 6.62. Kopf einer Milbe bei differentieller Bildaufspaltung



von Substanzen. Bei der Herstellung von optischem Glas dient sie zur Qualitätskontrolle. In der Biologie ist sie zur Brechzahlbestimmung des Zellinhalts und zur Verbesserung des mikroskopischen Bilds angewendet worden. In allen Fällen muß die Brechzahl des Einschlußmittels mit einem Refraktometer bestimmt werden. Deshalb soll zunächst erläutert werden, wie man das Interferenzmikroskop selbst als Refraktometer für die Brechzahlbestimmung des Einschlußmittels und der eingebetteten Probe benutzen kann.

Man bringt in einem eben geschliffenen Objektträger aus Glas eine kleine Vertiefung an, in die die zu messende Flüssigkeit gebracht wird, und verwendet eines der beschriebenen Interferenzverfahren, entweder ohne Beeinflussung der Vergleichswelle durch das Objekt nach Bild 6.38 oder das Shearingverfahren mit totaler Bildaufspaltung nach den Bildern 6.39 und 6.40. Sind Brechzahl des Trägerglases n_{Gl} und Tiefe d der kleinen Vertiefung bekannt, dann läßt sich durch Messen des Gangunterschieds Δ die Brechzahl der Flüssigkeit n_{Fl} bestimmen.

$$n_{Fl} = n_{Gl} + \Delta/d. \tag{6.17}$$

Sind aber Tiefe d und Brechzahl n_{Gl} unbekannt, dann lassen sich beide durch zwei Messungen mit Einbettungsmitteln bekannter Brechzahl bestimmen, wobei das eine Einbettungsmittel auch Luft sein kann. Die eigentlichen Schwierigkeiten bei der Herstellung einer solchen Vertiefung sind technologischer Natur, denn sie muß ganz bestimmte Bedingungen erfüllen.

1. Die Breite der Vertiefung muß kleiner sein als das Sehfeld des verwendeten Objektivs, möglichst kleiner als die Hälfte desselben. Bei starken Objektiven ist das Sehfeld im allgemeinen kleiner als 200 µm, d. h., die Breite muß dann auf jeden Fall kleiner als 200 µm oder besser kleiner als 100 µm sein.
2. Zur Erreichung einer hohen Meßgenauigkeit darf die Vertiefung nicht zu flach sein (tiefer als 10 µm).
3. Die Oberfläche der Vertiefung muß von guter optischer Qualität sein.
4. Die eingestellten Interferenzstreifen sollen sich vom Rand bis zur Talsohle verfolgen lassen, deshalb dürfen die Flanken nicht zu steil sein, weil die Zuordnung des neutralen Streifens im weißen Licht bei großen Gangunterschieden ziemlich schwierig und nicht ganz eindeutig ist.

Die letzte Bedingung läßt sich gut von einem eingeschliffenen Kugelsegment erfüllen; die ersten beiden aber nur, wenn man sich auf schwächere Objektive beschränkt. Ein solches Mikroskoprefraktometer wird von Opton, Oberkochen, [147] angeboten. Zur Messung wird die Anzahl der im Bild 6.63 sichtbaren Interferenzringe abgezählt und der Bruchteil eines Ringabstands mit dem Kompensator gemessen.

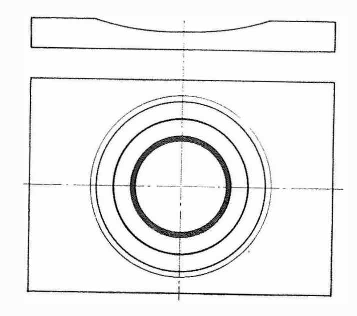


Bild 6.63. Interferenzstreifenverlauf an einem Kugelsegment

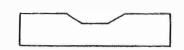


Bild 6.64. Objektträger mit gerader, trapezförmiger Nut als Mikroskoprefraktometer

Der VEB Carl Zeiss JENA liefert zum PERAVAL interphako eine Einrichtung für mikroskopische Refraktometrie, deren wichtigster Bestandteil, der Objektträger mit gerader trapezförmiger Nut, im Bild 6.64 schematisch dargestellt ist [133]. Die Tiefe der Nut ist > 10 µm bei einer Breite < 30 µm,

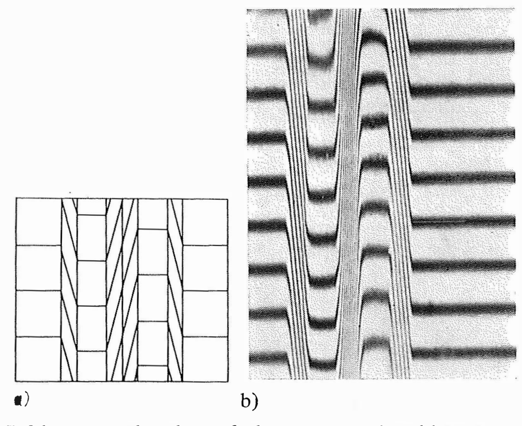


Bild 6.65. Mikroskoprefraktometer nach Bild 6.64 im Shearingverfahren bei totaler Bildaufspaltung mit Interferenzstreifen

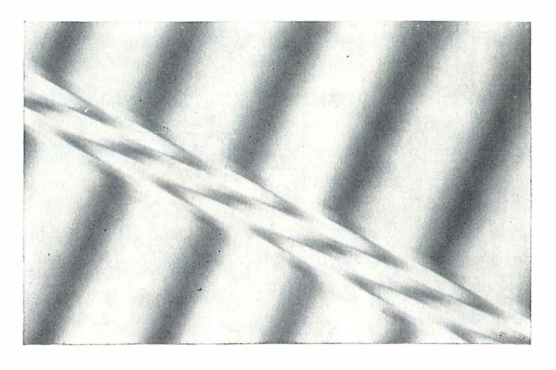
a) schematisch;
b) im Interferenzmikroskop

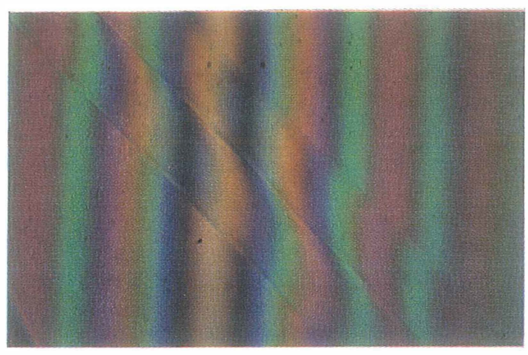
so daß ohne Schwierigkeiten auch mit den stärksten Objektiven gearbeitet werden kann. Es wird grundsätzlich das Shearingverfahren bei einer solchen Bildaufspaltung verwendet, daß sich die Doppelbilder der Nut gerade berühren. Dann ergibt sich bei Einstellung von Interferenzstreifen die Erscheinung der Bilder 6.65a und b. Der Böschungswinkel ist so bemessen, daß sich die Interferenzstreifen durch die ganze Nut hindurch verfolgen lassen. Zur Steigerung der Meßgenauigkeit wird von einem zum anderen Teilbild gemessen, und man erhält bei einem Meßfehler von $\lambda/300$ für den Gangunterschied einen Fehler in der Brechzahlbestimmung von $< 0{,}0002$. Da die Dispersion des Trägerglases bekannt ist oder leicht bestimmt werden kann, kann auch die Dispersion einer Flüssigkeit gemessen werden.

Die Brechzahlbestimmung nach der Immersionsmethode (s. Abschn. 6.1.2.7.) wird mit einem solchen Refraktometer sehr einfach. Nach Erreichen des Brechzahlabgleichs (Verschwinden des Objekts), der auch im Interferenzmikroskop nach dem Shearingverfahren auf dem soeben beschriebenen Objektträger durchgeführt wird, kann die Brechzahl der Flüssigkeit sofort gemessen werden, die dann mit der des Objekts übereinstimmt. Eine Temperaturmessung, die sonst den größten Fehler bringt, ist nicht erforderlich. Außerdem ist ein genauer Abgleich nicht mehr notwendig, weil schon bei annäherndem Abgleich aus dem gemessenen Gangunterschied die Brechzahldifferenz mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden kann, auch wenn die Objektdicke nur näherungsweise bekannt ist [134].

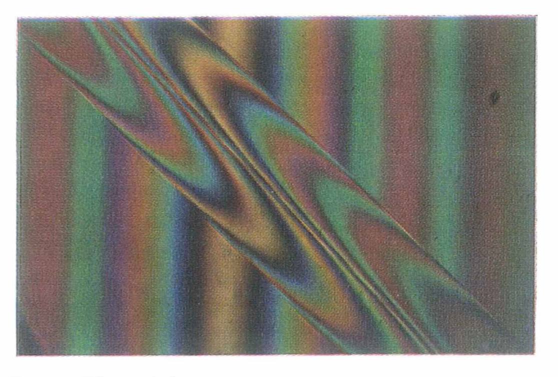
Im Bild 6.66 wird eine ummantelte Glasfaser, wie sie als Lichtleitkabel Verwendung findet, mit totaler Bildaufspaltung und Interferenzstreifen im Feld gezeigt. Die Brechzahl des Einschlußmittels ist zum Mantel abgeglichen, so daß aus der Streifenauslenkung die Brechzahl des Kerns bestimmt werden kann. Diese Messung ist für die Praxis wichtig, da die maximale Apertur der durch die Fasern geleiteten Strahlenbündel von der Brechzahldifferenz zwischen Kern und Mantel abhängt; denn die Lichtleitung erfolgt nach dem Prinzip der Totalreflexion, und der Grenzwinkel der Totalreflexion hängt von dieser Brechzahldifferenz ab.

Bild 6.66. Ummantelte Glasfaser im Shearingverfahren mit totaler Bildaufspaltung





a) Schwingungsrichtung senkrecht



b) parallel zur Faser

Bild 6.67. Vorverstreckte PAS-Faser im Shearingverfahren bei totaler Bildaufspaltung und Verwendung eines Polarisators im Beleuchtungsstrahlengang

Die Bilder 6.67a und b sind ebenfalls im Shearingverfahren mit totaler Bildaufspaltung aufgenommen worden. Es handelt sich um eine vorverstreckte Polyamidseidefaser im polarisierten Licht. Da die Faser doppelbrechend ist, ändert sich die Streifenauslenkung bei Drehung des im Beleuchtungsstrahlengang angeordneten Polarisators. Im Bild 6.67a, in dem die Schwingungsrichtung senkrecht zur Faser verläuft, ist die Brechzahl zur Umgebung fast abgeglichen, so daß nur eine geringe Streifenauslenkung auftritt. Aus der nach Drehung des Polarisators um 90° im

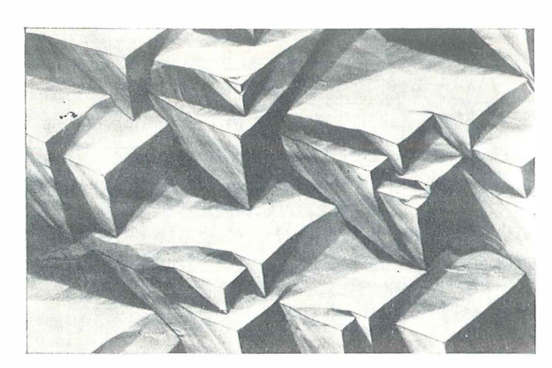


Bild 6.68. Ätzfiguren in einem Kalialaunkristall bei differentieller Bildaufspaltung

Bild 6.67b sichtbaren Interferenzstreifenauslenkung kann die Größe der Doppelbrechung bestimmt werden. Diese Größe ist von besonderer Bedeutung für die Fasertechnologie und deshalb wichtig für den Fertigungsprozeß.
Die Untersuchung anisotroper Präparate mit der Interferenzanordnung nach *Jamin-Lebedeff* ist von *Gahm* [145] beschrieben worden.
Bild 6.68 bringt ein Beispiel aus der Kristallografie. Es stellt Ätzfiguren in einem Kalialaunkristall bei differentieller Bildaufspaltung dar. Es können Aussagen über die Ebenheit und Neigung der geätzten Flächen gemacht werden. Ideal ebene Flächen müssen bei gleichmäßig gefärbter Umgebung auch gleichmäßig gefärbt erscheinen. Der Neigungswinkel ε kann nach Bild 6.69 durch die Beziehung $\tan \varepsilon = \Delta / a\Delta n$ ermittelt werden (Δn = Brechzahldifferenz), da $\Delta / \Delta n = d$ die der Aufspaltungsgröße a entsprechende Höhendifferenz zwischen den aufgespalteten Wellenfronten im Bereich der geneigten Fläche ist. Bei den Polarisationsinterferometern ist a eine vorgegebene feste Größe. Beim Interphako-Mikroskop ist sie variabel und läßt sich durch den Interferenzstreifenabstand in der Pupille sehr genau bestimmen. Wegen der allgemeineren Bedeutung dieser Methode für die Messung kleiner Größen in der Objektebene wird auf Abschn. 6.2.3.4. verwiesen. Oberflächenuntersuchungen mit Lackabzügen werden ebenfalls im Abschn. 6.2.3.4. behandelt.

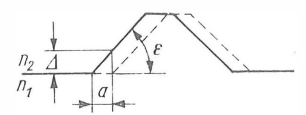


Bild 6.69. Zur Bestimmung des Neigungswinkels ε ($\Delta n = n_1 - n_2$)

6.1.4. Polarisationsmikroskopie

von Dr. rer. nat. *Hans Gause*

6.1.4.1. Bedeutung

Anregungen zum Bau und zur Verwendung von Polarisationsmikroskopen kamen vor allem von Mineralogen, Kristallografen und Petrografen.
Ein wichtiges Charakteristikum des Polarisationsmikroskops ist seine Verwendung als Meßinstrument an anisotropen mikroskopischen Objekten. Seine Anwendungsbreite hat sich durch die Erweiterung der Untersuchungsmethodiken wesentlich vergrößert. Überall da, wo es sich um die Untersuchung anisotroper mikroskopischer Strukturen handelt, ist seine Benutzung empfehlenswert und zweckmäßig. So wird es heute auch in der chemischen Mikroskopie, bei der Untersuchung von Produkten der technischen Gesteinskunde, in der Faserstoffmikroskopie, bei der Untersuchung des submikroskopischen Baus von Zellen und Geweben mit Vorteil angewendet. Auch bei der Untersuchung von Rohprodukten für die Glasindustrie und Keramik sowie von Kohlen und Salzen leistet das Polarisationsmikroskop wertvolle Dienste.
Die in der polarisationsoptischen Untersuchungsmethodik verwendeten Verfahren setzen die Kenntnis einiger Grundtatsachen aus dem Gebiet der Kristallografie und der Kristalloptik voraus. Da die Abhandlung der Grundbegriffe der Kristallografie über den Rahmen dieses Handbuches hinausgeht, wird dem daran stärker interessierten Leser das Studium eines entsprechenden Lehrbuchs [192] empfohlen. Die für das Verständnis der polarisationsoptischen Verfahren erforderlichen Grundtatsachen der Kristalloptik hingegen werden in den entsprechenden Abschnitten behandelt.

6.1.4.2. Polarisationsoptische Erscheinungen

Erzeugung polarisierten Lichts

Im Abschnitt 3.2. wurden die Grundlagen der Interferenz und Beugung behandelt. Dabei brauchte in Anwendung auf das Licht nur vorausgesetzt werden, daß es sich um eine Wellenstrahlung handelt, die sich mit endlicher Geschwindigkeit im Raume ausbreitet. Polarisation des Lichts ist nur mit der zusätzlichen Annahme transversaler, also senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung schwin-

gender Wellen zu verstehen. Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit der von *Maxwell* aufgestellten Theorie der elektromagnetischen Wellenstrahlung, wobei eine kausale Verknüpfung der in senkrecht zueinanderstehenden Ebenen schwingenden Vektoren der elektrischen und magnetischen Feldstärke besteht. Definitionsgemäß wird als Lichtvektor der Vektor der elektrischen Feldstärke bezeichnet, auf den sich alle weiteren Betrachtungen beziehen.

Bei einem Bündel natürlichen Lichts, das sich aus sehr vielen Wellenzügen zusammensetzt, schwingt zwar jeder Wellenzug ständig in der gleichen Ebene, doch besteht zwischen den einzelnen Wellenzügen keine nachweisbare Verknüpfung hinsichtlich Schwingungsrichtung und Phase, so daß jede Schwingungsrichtung gleichberechtigt vorkommt, das Licht also unpolarisiert ist.

Bei linear polarisiertem Licht hingegen schwingen die Lichtvektoren der verschiedenen Wellenzüge in der gleichen Ebene, so daß beim Durchgang durch optisch anisotrope Medien ein von der Schwingungsrichtung abhängiges Verhalten zu erwarten ist. Zu einer sichtbaren Interferenzerscheinung führen nur die Wellenzüge, die mit gleicher Frequenz in der gleichen Ebene schwingen.

Bei senkrecht zueinander linear polarisierten Wellenzügen gleicher Frequenz und zueinander festen Phasenbeziehungen ergibt sich eine Erscheinung, die (etwas formal) als elliptisch polarisiertes Licht bezeichnet wird (Bild 6.70a und b). Der Endpunkt des resultierenden Lichtvektors läuft in Spiralform auf dem Mantel eines elliptischen Zylinders um. Dieser Zylinder artet, je nach Phasendifferenz und Amplitudenverhältnis der Einzelschwingungen, zu einer Ebene (linear polarisiertes Licht) oder einem Kreiszylinder (zirkular polarisiertes Licht) aus. Linear polarisiertes Licht kann durch Reflexion, Doppelbrechung und dichroitische Absorption erzeugt werden. Heute werden dafür überwiegend die letztgenannten beiden Methoden benutzt, indem man natürliches Licht entweder durch aus doppelbrechenden Kristallen hergestellte Prismen oder durch Folien aus doppelbrechendem Material hindurchtreten läßt. Zu ersteren gehören vorwiegend Kalkspat-, aber auch Quarzprismen. Es können auch Prismen aus anderen, z. B. künstlich hergestellten Kristallen mit entsprechenden optischen Eigenschaften verwendet werden. Besonders geeignete Konstruktionen sind die nach *Nicol*, *Glan-Thompson* und nach *Ritter* bekanntgewordenen. Sie stellen auch heute noch die besten Polare für physikalische bzw. mikroskopische Untersuchungen dar. Sie haben geringe Absorption und liefern in gekreuzter Stellung dunkelste Auslöschung.

Im Bild 6.71 wird das Konstruktionsprinzip eines Nicolschen Prismas gezeigt. Beim Eintreten in den Kalkspat wird das Licht in zwei Anteile zerlegt, die senkrecht zueinander schwingen. Der eine Anteil tritt durch das besonders präparierte

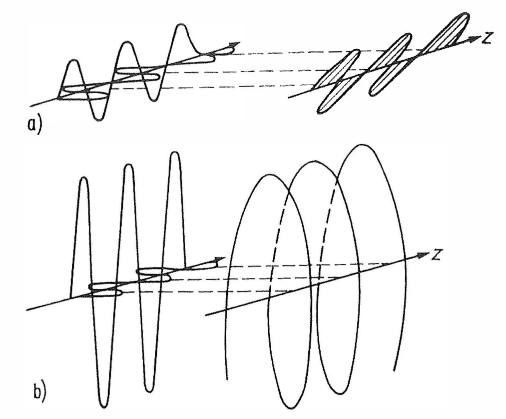


Bild 6.70. Fortpflanzung von Lichtwellen

a) Zusammensetzung zweier senkrecht zueinander in Phase schwingender transversaler Wellen gleicher Amplitude (nach *R. W. Pohl*);

b) Zusammensetzung zweier senkrecht zueinander schwingender transversaler Wellen ungleicher Amplitude, die vertikal schwingende eilt mit einem Gangunterschied von $\lambda/4$ voraus (nach *R. W. Pohl*)

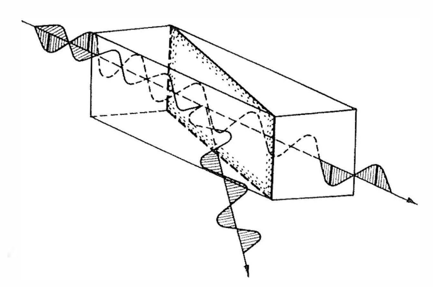


Bild 6.71. Nicolsches Prisma

hergestellt aus Kalkspat, geschliffen nach besonderen Vorschriften und dann mit Kanadabalsam zusammengekittet (punktierte Fläche). Von links fällt auf dieses Prisma gewöhnliches Licht. Von den möglichen Schwingungsrichtungen sind wegen der Übersichtlichkeit nur zwei senkrecht zueinanderliegende deutlich hervorgehoben. Von den beiden aufgespalteten Komponenten durchwandert die außerordentliche Welle die beiden verkitteten Teile des Prismas und verläßt das Prisma nach rechts. Die ordentliche Welle wird an der Trennfläche reflektiert und tritt entweder seitlich aus dem Prisma aus oder wird an einer dort angebrachten Schicht absorbiert

Prisma hindurch. Die andere Komponente wird an einer Kittfläche geeigneter Wahl der Brechzahl des Kitts herausreflektiert.
Da der Kalkspat selten geworden ist, werden für viele Untersuchungen Polare aus dichroitischen Plastfolien verwendet, die die eine der linear polarisierten Komponenten absorbieren.
Polare sind wegen ihrer Kittung wärmeempfindlich und die Folienpolare zusätzlich durch fremde chemische Einflüsse oder durch UV- und IR-Strahlung gefährdet. Man soll diese Polare deshalb nicht dort in den Strahlengang bringen, wo Bilder von Strahlenquellen entstehen. Auch der Einwirkung von Sonnenstrahlen sind diese Polare fernzuhalten. Bei feuchtwarmem Klima ist für gute Luftzirkulation zu sorgen, um ein frühzeitiges Zerstören der Polare durch Funguseinwirkung zu vermeiden.

Lichtausbreitung in anisotropen Medien

In isotropen Medien fällt die Strahlrichtung als Richtung des Energietransports mit der Richtung der Wellennormale zusammen (Bild 6.72a). In anisotropen Medien ist das nur für den ordentlichen Strahl der Fall. Für den außerordentlichen Strahl hat man zwischen einer Normalen- und Strahlenrichtung und damit auch zwischen einer Normalen- und Strahlengeschwindigkeit zu unterscheiden (Bild 6.72b). Sie stimmen nur in ausgezeichneten Richtungen – den optischen Achsen – überein. Je nachdem, ob eine oder zwei ausgezeichnete Richtungen existieren, spricht man von optisch ein- oder zweiachsig. Diese Erscheinung leitet sich daraus ab, daß die Lichtgeschwindigkeit und damit auch die Brechzahl für den außerordentlichen Strahl richtungsabhängig sind. Die angegebene Brechzahl bezieht sich immer auf die Geschwindigkeit in Richtung der Normalen (Normalengeschwindigkeit).
Bei nichtkubischen Kristallen (siehe Abschnitt 6.1.4.2.) wird ein eindringender Lichtstrahl in zwei Richtungen aufgespaltet. Bei den einachsigen Kristallen ist die Brechzahl der einen Komponente richtungsunabhängig, die der anderen richtungsabhängig. Erstere wird als ordentlicher Strahl und letztere als außerordentlicher Strahl bezeichnet. Bei den zweiachsigen Kristallen sind die Brechzahlen beider Komponenten richtungsabhängig.

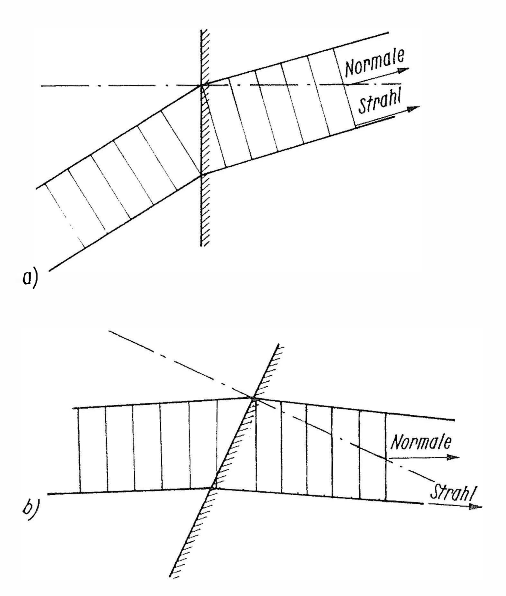


Bild 6.72. Normalen- und Strahlrichtung in anisotropen Körpern

a) Übereinstimmung beim ordentlichen Strahl;
b) Unterschied beim außerordentlichen Strahl

Indikatrix einachsiger Kristalle

Zur übersichtlichen Charakterisierung der richtungsabhängigen Brechzahl im Kristall wurden im Laufe der Entwicklung verschiedene geometrische Konstruktionsflächen vorgeschlagen. Hier sollen nur die Eigenschaften der Indikatrix, des Indexellipsoids beschrieben und ihre praktische Nutzung in der Polarisationsmikroskopie dargestellt werden. Diese einschalige Bezugsfläche unterscheidet sich für einachsige Kristalle wegen des Vorhandenseins einer Rotationssymmetrie grundsätzlich von der entsprechenden Form für zweiachsige Kristalle, denen diese Symmetrie fehlt. Das Indexellipsoid für einachsige Kristalle ist ein Rotationsellipsoid mit den Hauptachsen x, y, z. Es wird erhalten, indem man von einem gedachten Mittelpunkt in allen Richtungen die Brechzahlen der in diesen Richtungen schwingenden Komponenten der Lichtvektoren aufträgt. Die Richtung der Wellennormalen steht darauf senkrecht. Wie im Bild 6.73 ersichtlich, sind die Achsen x und y wegen der in der z-Richtung vorhandenen Rotationssymmetrie gleichwertig. Die in diesen Richtungen schwingenden Wellen haben gleiche Geschwindigkeit und damit gleiche Brechzahl. Es ist die des ordentlichen Strahls (n_ω oder n_0); in der Längsachse z schwingt der in der xy-Ebene verlaufende außerordentliche Strahl (n_ε oder n_e). Da zwei unterschiedliche Brechzahlen auftreten, spricht man von Doppelbrechung. Die Richtung z wird als optische Achse bezeichnet. Sie steht senkrecht auf der durch x und y hindurchge-

henden Kreisfläche und entspricht einer kristallografischen Symmetrieachse. Man unterscheidet verlängerte und abgeplattete Indexellipsoide, je nachdem, ob $n_\varepsilon > n_\omega$ oder $n_\varepsilon < n_\omega$ ist. Im ersten Fall spricht man von positiv und im zweiten Fall von negativ einachsigen Kristallen.
Man kann drei besondere Arten des Lichteinfalls in bezug auf die Achsen unterscheiden.

1. Das Licht fällt parallel zur z-Achse also, in Richtung der optischen Achse ein; in dieser Richtung findet keine Doppelbrechung statt. Das hindurchtretende natürliche Licht schwingt in allen Richtungen senkrecht zur Einfallsrichtung. Daher hat diese Achsenrichtung auch die Bezeichnung Achse der Isotropie.
2. Das Licht fällt senkrecht zur optischen Achse ein. Die Differenz der Brechzahlen hat in dieser Richtung ihren größten Wert. Jede einfallende Welle wird in zwei Wellen mit unterschiedlichen Schwingungsrichtungen zerlegt; eine parallel der Achsenrichtung z und eine senkrecht dazu. Dies sind die beiden Hauptschwingungsrichtungen.
3. Die Einfallsrichtung des Lichts kann schräg zu den Hauptschwingungsrichtungen unter verschiedenen Winkeln erfolgen (s. Bild 6.73).

Die zu dieser Richtung gehörenden Brechzahlen des ordentlichen und außerordentlichen Strahls werden wie folgt bestimmt:
Da beliebige ebene Schnitte durch ein Rotationsellipsoid Ellipsen darstellen, sind die in beliebiger Richtung wirksamen Brechzahlen durch die Schnittellipse bestimmt, die senkrecht auf der Einfallsrichtung des Lichts steht. Ihre Achsen entsprechen den Brechzahlen und bestimmen gleichzeitig die Schwingungsrichtungen dieser

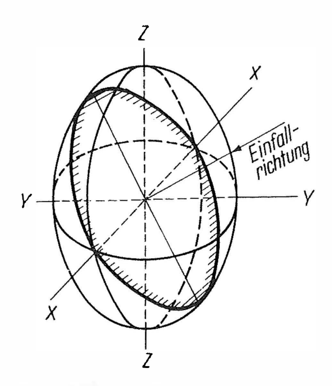


Bild 6.73. Indikatrix eines einachsigen Kristalls mit Wellennormale und zugehöriger Schnittellipse (nach Kleber)

beiden Komponenten. Die beiden für die Fortpflanzung des Lichts im Kristall verantwortlichen Komponenten schwingen senkrecht zueinander. Bei beliebiger Fortpflanzungsrichtung entspricht die Brechzahl der einen Komponente stets einem der beiden Extremwerte; es ist der der ordentlichen Welle. Der Extremwert der außerordentlichen Welle ergibt sich bei Eintritt des Lichts senkrecht zur optischen Achse. Die Indikatrix ist unterschiedlich für verschiedene Lichtwellenlängen, doch ändert sich die Lage der optischen Achse einachsiger Kristalle nicht mit der Wellenlänge. Sie entspricht der kristallografischen Hauptachse. Zu den optisch einachsigen Kristallen gehören solche, die tetragonal, hexagonal (trigonal) oder hexagonal-rhomboedrisch kristallisieren.

Indikatrix zweiachsiger Kristalle

Die Indikatrix zweiachsiger Kristalle, zu denen diejenigen zählen, die im rhombischen, monoklinen und triklinen System kristallisieren, ist ein dreiachsiges Ellipsoid. Als Symmetrieachsen des dreiachsigen Ellipsoids werden die drei Hauptbrechzahlen n_α, n_β, n_γ (s. Abschn. 6.1.4.2.) verwendet, und zwar auf drei zueinander senkrecht stehenden Achsen. Dabei gilt die Bedingung $n_\gamma > n_\beta > n_\alpha$, d.h., die entsprechenden Lichtgeschwindigkeiten im Kristall genügen folgenden Beziehungen: $c_\alpha > c_\beta > c_\gamma$.
Im Bild 6.74 sind die geometrischen Verhältnisse dieser Indikatrix zu erkennen. Für die Bestimmung der Brechzahlen und Schwingungsrichtungen in Einfallsrichtung y ist die Schnittellipse xz mit den Achsen n_α und n_γ maßgebend. Für die Einfallsrichtungen x und z gilt das entsprechend der Schnittellipsen yz und xy. Zu jeder Richtung kann man auch hier eine dazu senkrecht liegende Schnittellipse konstruieren, in der die beiden Hauptachsen die Brechzahlen der beiden sich in der angegebenen Richtung fortpflanzenden Wellen darstellen und gleichzeitig ihre Schwingungsrichtungen festlegen.
Die im Bild 6.74 in der Zeichenebene liegende Symmetrieebene (yz) hat z.B. eine in ihr liegende Strahlenrichtung A_s; die der Strahlenrichtung parallele Tangente an die in der Zeichenebene liegende Schnittellipse berührt diese in R. Die Schnittellipse durch R und AA' steht senkrecht auf der zu A_s gehörigen Richtung der Wellennormalen A_w. Die beiden Hauptachsen der schraffierten Ellipse entsprechen den Brechzahlen n_α und n'_γ (wobei n'_γ einem zwischen n_α und n_γ gelegenen Wert entspricht) und ihre Richtungen

den Schwingungsrichtungen der beiden Komponenten.
In einem dreiachsigen Ellipsoid gibt es zwei Schnittebenen, in denen die Ellipse zu einem Kreis entartet. In ihnen entsprechen die beiden Brechzahlen der Größe n_β. Die dazugehörigen Wellennormalenrichtungen bezeichnet man als optische Achsen oder Binormalen. Sie werden ebenfalls als Achsen der optischen Isotropie angesehen, obwohl keine von ihnen vollständig einer solchen genügt. Wegen Vorhandenseins zweier

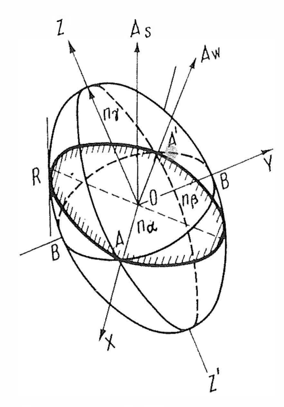


Bild 6.74. Indikatrix zweiachsiger Kristalle mit zugehöriger Schnittellipse

x, y, z Achsen des dreiachsigen Ellipsoids; A_s Strahlrichtung; A_w Richtung der zugehörigen Wellennormalen; n_α, n_β n_γ, Hauptbrechzahlen

Richtungen spricht man von optisch zweiachsigen Kristallen. Die Ebene, in der die beiden Achsen liegen, bezeichnet man als Achsenebene. Der Winkel zwischen den beiden Achsenrichtungen ist der Achsenwinkel 2 V. Der Zusammenhang dieses Winkels mit den Hauptbrechzahlen eines Kristalls läßt sich wie folgt darstellen:

$$\sin V = \frac{n_\gamma}{n_\beta} \sqrt{\frac{n_\beta^2 - n_\alpha^2}{n_\gamma^2 - n_\alpha^2}} .$$

Die Winkelhalbierende des spitzen Achsenwinkels wird als spitze Bisektrix oder erste Mittellinie bezeichnet, die des stumpfen Winkels als stumpfe Bisektrix oder zweite Mittellinie. Die Richtung n_β ist die der optischen Normalen. Auch hier unterscheidet man zwischen positiven und negativen Kristallen. Ist n_γ spitze Bisektrix, so bezeichnet man den Kristall als optisch positiv zweiachsig; ist es dagegen n_α, so ist der Kristall optisch negativ zweiachsig. Bei rhombischen Kristallen liegen die Achsen der Indikatrix parallel zu den Kristallachsen; bei monoklinen Kristallen liegt nur eine Achse der Indikatrix parallel mit der y-Achse, und bei triklinen Kristallen gibt es keine Beziehungen zwischen den Achsen der Indikatrix und den Kristallachsen. *Fresnel* [185] hat eine Konstruktion angegeben, nach der es möglich ist, mit dem stereografischen Netz für eine beliebige Wellenrichtung die beiden Schwingungsrichtungen zu bestimmen.

Doppelbrechung

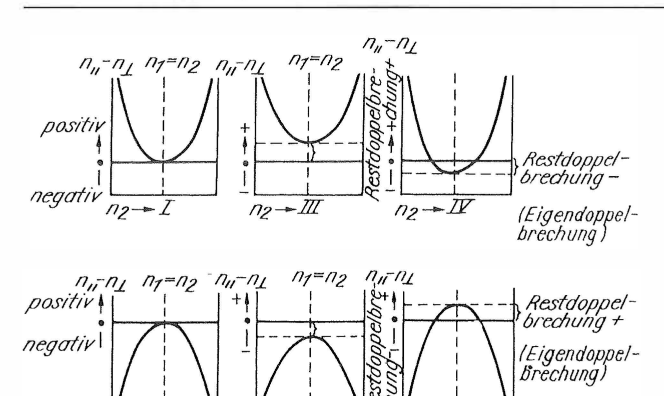
Das Maß der Doppelbrechung ist durch den Unterschied der beiden Brechzahlen im Kristall gegeben. Bei einachsigen Kristallen bezeichnet man die Differenz der Hauptbrechzahlen ($n_\varepsilon - n_\omega$) als Hauptdoppelbrechung. Bei zweiachsigen Kristallen, die drei Hauptbrechzahlen haben, unterscheidet man drei Hauptdoppelbrechungen ($n_\gamma - n_\beta$), ($n_\gamma - n_\alpha$), ($n_\beta - n_\alpha$).
Für beliebige andere Richtungen liegen die Werte der Doppelbrechung zwischen den Extremwerten. Die Untersuchung der Doppelbrechung wurde zu einem ausgezeichneten diagnostischen Verfahren ausgearbeitet. Sie spielt auch auf verschiedenen Gebieten der organischen Welt eine Rolle. Man kennt in der Biologie und Medizin ebenfalls Strukturen verschiedener Brechzahl und hat Verfahren zu ihrer Bestimmung ausgearbeitet, z.B. die Einbettungsmethode oder Imbibitionsmethode (s. Abschn. 6.1.4.4.).
In biologischen Strukturen tritt z. B. auch Doppelbrechung auf, wenn die einzelnen Komponenten nicht doppelbrechend sind, aber unterschiedliche Brechzahlen n_1 und n_2 haben. Man spricht in diesem Fall von der Formdoppelbrechung, weil sie wesentlich von der Form der Komponenten abhängt. Nach einer von *Wiener* 1912 aufgestellten Theorie von den Mischkörpern wird entsprechend seinem Aufbau zwischen Stäbchen- und Schichtendoppelbrechung unterschieden [183]. Für die Stäbchendoppelbrechung ist

$$n_a^2 - n_0^2 = \frac{\delta_1 \delta_2 (n_1^2 - n_2^2)^2}{(\delta_1 + 1) n_2^2 + \delta_2 n_1^2}$$

und für die Schichtendoppelbrechung

$$n_a^2 - n_0^2 = \frac{\delta_1 \delta_2 (n_1^2 - n_2^2)^2}{\delta_1 n_1^2 + \delta_2 n_2^2} .$$

Hierin bedeuten n_a und n_0 die extremen Brechzahlen des Mischkörpers, δ_1 und δ_2 die Teilvolumina der Anteile und n_1 und n_2 ihre Brech-



I positive Formdoppelbrechung und fehlende Restdoppelbrechung (Beispiel: Tonerdefasern); *II* negative Formdoppelbrechung und fehlende Restdoppelbrechung (Beispiel: kombiniertes Gelatine-Gel); *III* positive Formdoppelbrechung und positive Restdoppelbrechung (Beispiel: Zellulosefasern); *IV* negative Formdoppelbrechung und negative Restdoppelbrechung (Beispiel: eingetrocknetes Zellulose-Gel); *V* positive Formdoppelbrechung und negative Restdoppelbrechung (Beispiel: Zelluodin); *VI* negative Formdoppelbrechung und positive Restdoppelbrechung (Beispiel: Hummerpanzer als ganzes System)

Bild 6.75. Die sechs Doppelbrechungstypen nach H. Ambronn und A. Frey aus H. H. Pfeiffer

zahlen; bei $n_1 = n_2$ fällt die Doppelbrechung weg (Fall der optischen Homogenisierung); bei $\delta_1 = \delta_2$ wird maximale Doppelbrechung erreicht. Weiter kann man aus den Gleichungen ersehen, daß die Stäbchendoppelbrechung stets positiv und die Schichtendoppelbrechung stets negativ ist. Sind die Komponenten selbst doppelbrechend, so tritt zur Formdoppelbrechung noch die Eigendoppelbrechung hinzu; die Summe bildet die Gesamtdoppelbrechung. So sind nach der Theorie sechs Kombinationen möglich, die aus der grafischen Darstellung im Bild 6.75 zu erkennen sind.

Gangunterschied und Interferenzfarbe

In der Polarisationsmikroskopie interessiert vor allem die Zusammensetzung von Lichtschwingungen gleicher Frequenz mit parallelen und senkrecht zueinanderstehenden Schwingungsebenen bei verschiedener Phase und gleichen oder verschiedenen Amplituden. Drückt man die Phasendifferenz zweier Schwingungen in der Form $\delta = (x_1 - x_2)\, 2\pi/\lambda$ aus, so wird die lineare Wegdifferenz $x_1 - x_2$ als Gangunterschied R in Längeneinheiten bzw. in Wellenlängen λ bezeichnet.
Betrachten wir den ersten Fall, bei dem zwei Schwingungen gleicher Schwingungsebene und Frequenz, aber verschiedener Phase vorliegen. Die beiden Schwingungen können durch folgende Gleichungen dargestellt werden:

$$y_1 = a_1 \sin(\omega t + \varphi_1),$$
$$y_2 = a_2 \sin(\omega t + \varphi_2).$$

Hierin bedeuten a_1 und a_2 die Amplituden, ω die Kreisfrequenz $2\pi\nu$, ν die Schwingungszahl, t die Zeit und φ_1 und φ_2 die Phasenwinkel.

Die Zusammensetzung dieser Schwingungen ergibt für die resultierende Amplitude

$$a = \sqrt{a_1^2 + a_2^2 + 2a_1 a_2 \cos\delta}$$

mit

$$\delta = \varphi_2 - \varphi_1 .$$

Es interessieren folgende Spezialfälle:

a) Bei gleicher Amplitude ($a_1 = a_2$) ist die Phasendifferenz $\delta = (2k + 1)\pi$ oder der Gangunterschied $R = (2k + 1)\lambda/2$; dann erhält man für die resultierende Amplitude $a = 0$. Die beiden Wellen werden durch Interferenz ausgelöscht.
b) Bei gleicher Amplitude ($a_1 = a_2$) und einer Phasendifferenz von $2k\pi$ oder einem Gangunterschied von $2k\lambda/2 = k\lambda$ wird $a = 2a_1$. Die Amplitude der resultierenden Schwingung ist also gleich der Summe derjenigen der Ausgangsschwingungen. Sie überlagern sich in maximaler Verstärkung.

Die Kombination zweier senkrecht zueinander schwingender Wellen gleicher Frequenz mit den Amplituden a und b und der Phasendifferenz δ führt zu einer Schwingungsbahn, die nach Elimination der Zeit aus den Gleichungen für x und y durch folgende Gleichung dargestellt wird:

$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} - \frac{2xy}{ab}\cos\delta - \sin^2\delta = 0.$$

Dabei wird angenommen, daß die Fortpflanzungsrichtung die z-Achse ist und die beiden Schwingungsrichtungen in der x- bzw. y-Richtung des Koordinatensystems liegen. Die angeführte Gleichung ist die eines Kegelschnitts.

Die Auswertung dieser Gleichung ergibt, daß bei bestimmt gewählten Ausgangswerten von δ, a und b verschieden schwingendes Licht erhalten und als linear, zirkular oder elliptisch polarisiert bezeichnet wird. Man meint damit, daß der Endpunkt des Lichtvektors, auf eine zur Fortpflanzungsrichtung senkrechte Ebene projiziert, entweder eine lineare, zirkulare oder elliptische Bewegung ausführt.

Die soeben besprochenen beiden Fälle der Zusammensetzung von Schwingungen sind gut zu beobachten an Kristallen, die, zwischen zwei Polare – den Polarisator und den Analysator – gebracht, zu Interferenzerscheinungen führen, wenn man sie mit weißem oder monochromatischem Licht durchstrahlt. Dabei unterscheidet man zwei Beobachtungsarten: Bei der einen, die man früher als orthoskopische, heute besser als direkte Beobachtungsart bezeichnet, wird das Objekt in seiner Einwirkung auf polarisiertes Licht beobachtet; bei der anderen studiert man die Interferenz polarisierten Lichts in verschiedenen Parallelstrahlenbündeln, also in verschiedenen Richtungen des vom Objekt ausgehenden Lichts. Letztere Beobachtungsart ist die konoskopische oder die indirekte.

Wir wenden uns zunächst der erstgenannten Beobachtungsart zu. Die in doppelbrechenden Kristallplatten bei Lichteintritt durch Aufspaltung entstehenden zwei Wellen haben verschiedene Geschwindigkeiten und demgemäß verschiedene Brechzahlen. Ihre Schwingungsrichtungen stehen aufeinander senkrecht. Ihre Brechzahlen n'_γ, n'_α lassen sich bei bekannter beliebiger Lage der Indikatrix aus den Hauptbrechzahlen n_γ und n_α berechnen [189]. Im Bild 6.76 ist die Komponentenzerlegung für den Spezialfall $n'_\gamma = n_\gamma$ und $n'_\alpha = n_\alpha$ ersichtlich.

Die beiden Komponenten erhalten aufgrund ihrer verschiedenen Fortpflanzungsgeschwindigkeit in einer Kristallplatte der Dicke d einen Gangunterschied R, der der Plattendicke und der Doppelbrechung proportional ist:

$$R = d\,(n'_\gamma - n'_\alpha). \tag{6.18a}$$

Daraus ergibt sich die Phasendifferenz

$$\delta = \frac{2\pi R}{\lambda}. \tag{6.18b}$$

Durch den hinter der Kristallplatte angebrachten Analysator, dessen Schwingungsrichtung senkrecht zu der des Polarisators steht (gekreuzte Polare), werden von den im Kristall erzeugten beiden Komponenten nur die in Schwingungs-

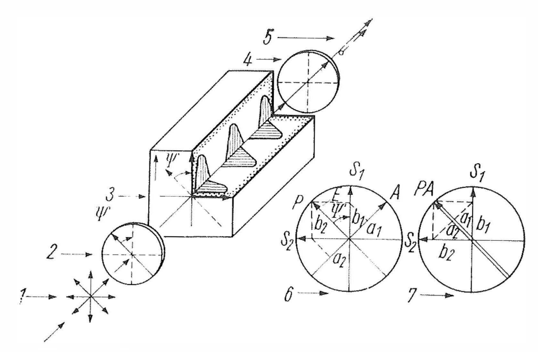


Bild 6.76. Durchgang linear polarisierten Lichts durch eine anisotrope Kristallplatte, parallel zur optischen Achse geschnitten

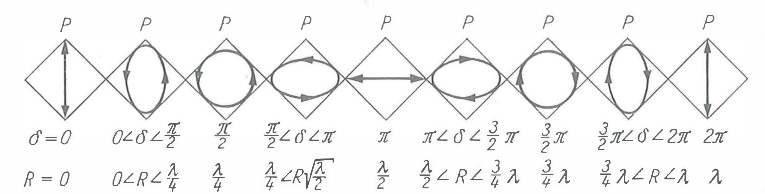
Die Verzögerung der einen Komponente gegenüber der anderen Schwingungskomponente ist dargestellt, gleichfalls die Projektion der Amplitude der einfallenden Welle in eine Ebene senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung des Lichts
1 natürliches Licht; *2* Polarisator, dessen Schwingungsrichtung unter 45° zu den Schwingungsrichtungen in der Kristallplatte liegt; *3* Kristallplatte mit durch Pfeil (links oben) angedeuteter Achsenrichtung sowie Lage der Hauptschwingungsrichtungen und der Schwingungsrichtung des Polarisators (Ψ); *4* Analysator mit senkrecht zum Polarisator liegender Schwingungsrichtung; *5* Austritt des durch Interferenz erzeugten polarisierten Lichts; *6* Komponentenzerlegung der Amplitude E in b_1 und b_2 bzw. a_1 und a_2 bei gekreuzten Schwingungsrichtungen von Polarisator und Analysator; *7* Komponentenzerlegung der Amplitude E in b_1 und b_2 bzw. a_1 bzw. a_2 bei parallelen Schwingungsrichtungen von Polarisator und Analysator
(S_1 und S_2 bedeuten die beiden im Kristall möglichen Schwingungsrichtungen)

richtung des Analysators liegenden hindurchgelassen. Man erhält somit eine resultierende Schwingung, die sich aus den Einzelkomponenten unter Berücksichtigung des Gangunterschieds zusammensetzt. Für die Intensität des hindurchgelassenen Lichts bei gekreuzten und parallelen Polaren hat *Fresnel* folgende Gleichungen abgeleitet:

$$I_+ = I_0 \sin^2 2\psi \sin^2 \frac{\pi R}{\lambda}, \tag{6.19a}$$

$$I_\| = I_0 \left[1 - \sin^2 2\psi \sin^2 \frac{\pi R}{\lambda}\right]. \tag{6.19b}$$

I_0 ist die Intensität des einfallenden Lichts, ψ nach Bild 6.76 der Winkel zwischen der Richtung einer Hauptbrechzahl des Kristalls, kurz Schwingungsrichtung im Kristall genannt, und der Schwingungsrichtung des Polarisators. Eine allgemeine Diskussion der ersten dieser beiden Gleichungen ergibt, daß bei gekreuzten Polaren die aus-



Beim Durchlaufen des Wertes δ von 0 bis 2π bzw. R von 0 bis λ ändert sich der resultierende Schwingungszustand zweimal linear über das elleptisch und zirkular wieder zum linear polarisierten Licht

Bild 6.77. Schwingungszustände polarisierten Lichts in Abhängigkeit von der Phase (δ) bzw. vom Gangunterschied (R)

tretende Intensität des Lichts von ψ und der Größe $\sin^2(\pi R/\lambda)$ abhängt. Bei $\psi = 0$ und $\psi = \pi/2$ ist die hindurchgelassene Intensität unabhängig vom zweiten Faktor gleich Null. Man bezeichnet diese Stellungen als Auslöschungs- bzw. Dunkelstellungen. Beim Drehen einer Kristallplatte zwischen gekreuzten Polaren um 360° tritt somit viermalige Auslöschung ein. I_+ wird ein Maximum für $\sin^2 2\psi = 1$, d.h. für $\psi = \pi/4$, wenn die Schwingungsrichtungen der Kristallplatte mit denen des Polarisators und des Analysators einen Winkel von 45° bilden. Diese Stellungen nennt man 45°- oder Diagonalstellungen.

Es wird $\sin^2 \pi R/\lambda$ für $R = (2k + 1)\,\lambda/2$ zu einem Maximum, d.h., wenn der Gangunterschied der Kristallplatte einer ungeraden Anzahl von halben Wellenlängen entspricht. Es wird hingegen Null, wenn $R = k\lambda$ ist, d.h. bei einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge. Das aus dem Kristall austretende Licht ist im allgemeinen elliptisch polarisiert.

Die Schwingungsform hängt, wie im Bild 6.77 dargestellt, von R ab [185]. Hier ist die Orientierung des Polarisators in Nordsüdrichtung angenommen, die Hauptschwingungsrichtungen der Kristallplatte liegen diagonal, die in Richtung NW–SO schwingende Welle ist gegenüber der nach NO–SW schwingenden als verzögert angenommen. Eine $\lambda/4$-Platte wird dazu benutzt, in 45°-Stellung zu einem Polar zirkular polarisiertes Licht herzustellen (zirkularer Polar).

Die sich aus den Gln. 6.19a und b ergebenden Konsequenzen lassen sich für verschiedene Wellenlängen sehr gut an einem keilförmig geschliffenen Kristallpräparat, etwa aus Quarz oder Gips studieren. Bei Verwendung monochromatischen Lichts entstehen in einem solchen Präparat Streifensysteme von hellen und dunklen Bereichen. Die Bedingungen dafür sind:

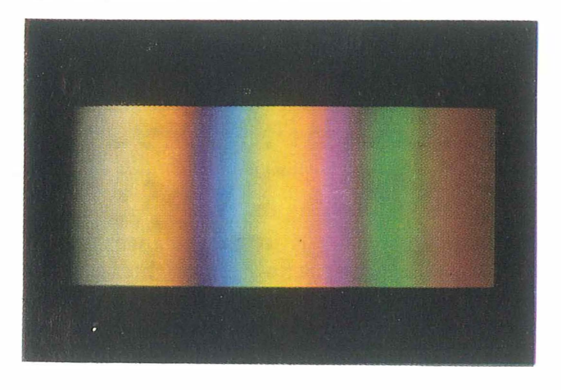
Helligkeit bei $R = (2k + 1)\,\lambda/2$,

Dunkelheit bei $R = (2k)\,\lambda/2 = k\lambda$.

Je nach benutzter Wellenlänge sind die Abstände der hellen und dunklen Streifen unterschiedlich, im UV enger als im IR. Der Streifenabstand hängt vom Keilwinkel und der wirksamen Doppelbrechung ab. Bei Verwendung von weißem Licht geht dieses Streifensystem in ein kontinuierliches Farbband, die Interferenzfarbfolge über. Diese Erscheinung bezeichnet man auch als chromatische Polarisation. Da bestimmte Wellenlängen aus dem sichtbaren Spektrum durch Interferenz ausgelöscht oder geschwächt werden, entspricht die Farbfolge den Restfarben des Spektrums. Die normale Interferenzfarbfolge (Bild 6.78), die weitgehend der in den Newtonschen Interferenzringen auftretenden entspricht, wird zur besseren Orientierung in Ordnungen eingeteilt, wobei die 1. Ordnung konventionell bis zu der $R = 551$ nm entsprechenden Stelle geht, die 2. bis $R = 1102$ nm, die 3. Ordnung bis $R = 1653$ nm usw. gerechnet wird. So bezeichnet man die einem Gangunterschied $R = 551$ nm entsprechende Interferenzfarbe als Rot 1. Ordnung, die zu $R = 750$ nm gehörende als Grün 2. Ordnung usw. Kräftige Farbtöne treten in der 1. Ordnung auf, in höheren Ordnungen verblassen die Farben; die Mischfarben

Bild 6.78. Interferenzfarben eines Quarzkeils in drei Ordnungen

praktische Farbfolge von Newtonschen Interferenzstreifen in weißem Licht von links 0. Ordnung nach rechts 3. Ordnung. Höhere Ordnungen zeigen neben Grün und Rot später noch sog. „Weiß höherer Ordnung“



höherer Ordnungen gehen in ein Interferenzweiß über.
Die Interferenzfarbfolge, die bei Verwendung parallel orientierter Polare auftritt, ist der bei gekreuzten Polaren auftretenden komplementär. Normale Farbfolgen treten dann auf, wenn $n_\gamma - n_\alpha$ für den ganzen sichtbaren Spektralbereich einen möglichst konstanten Wert hat. Diese Bedingung findet man z.B. beim Quarz und Gips praktisch erfüllt.

Überlagerungen von Kristallplatten im polarisierten Licht bei direkter Beobachtung

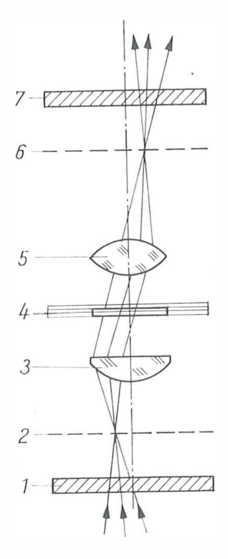
Hier kann man wegen ihrer charakteristischen Erscheinungen zwei Fälle unterscheiden,

1. bei paralleler Lage der Schwingungsrichtungen und
2. bei nichtparalleler Lage der Schwingungsrichtungen in den Kristallplatten.

Grundsätzlich erfolgen solche Beobachtungen in der Diagonalstellung, d.h. 45° zu den Schwingungsrichtungen der Polare. Werden die Schwingungsrichtungen in den beiden übereinander zu legenden Platten mit n'_γ und n'_α sowie n''_γ und n''_α bezeichnet, so sind eine Additionslage und eine Subtraktionslage möglich, d.h., entweder fallen entsprechende Schwingungsrichtungen zusammen (n'_γ mit n''_γ und n'_α mit n''_α), oder es fallen jeweils die Schwingungsrichtungen der langsamen und der schnellen Wellen (n'_γ mit n''_α und n''_γ mit n'_α) zusammen. Im ersteren Fall addieren sich die in den Platten erzeugten Gangunterschiede, im zweiten Fall werden sie subtrahiert. Sind beide gleich groß, so kompensiert sich der Gangunterschied zu Null. Wird auf einer der Platten die Schwingungsrichtung der schnellen oder der langsamen Welle markiert, so kann man durch Überlagerung mit einer Kristallplatte unbekannter Orientierung die relative Lage der Schwingungsrichtungen der beiden für den Gangunterschied maßgebenden Brechzahlen bestimmen; denn mit der Erhöhung oder Erniedrigung bzw. Kompensation des Gangunterschieds treten Veränderungen der Interferenzfarben ein, die als Kriterium bei der Bestimmung dieser Daten zu benutzen sind. Die Hilfsplättchen werden allgemein als Kompensatoren bezeichnet und sind jedem Polarisationsmikroskop in besonderer Fassung mit Markierung der Richtung der langsamsten Welle (n_γ) beigegeben. Die bekanntesten Kompensatoren dieser Art sind die Plättchen Rot I oder λ, das $\lambda/4$-Plättchen und der Quarzkeil. Sie werden aufgrund der geschilderten Eigenschaften dazu benutzt, um z.B. zu entscheiden, welcher Ordnung eine Farbe angehört, und dienen damit zur Abschätzung eines Gangunterschieds. Ihre sonstige Verwendung am Polarisationsmikroskop wird im Abschn. 6.1.4.4. behandelt.

Kristallplatten im polarisierten Licht bei indirekter Beobachtung

Bei indirekter Beobachtung wird mit möglichst großer Apertur beleuchtet. Das von den einzelnen Punkten der Lichtquelle bzw. der Aperturblende ausgehende Licht durchsetzt das Objekt (Bild 6.79) als parallele linear polarisierte Lichtbündel unterschiedlicher Richtung, die in der hinteren Brennebene eines abbildenden Objektivs bei gekreuzten oder parallelstehenden Polaren ein Interferenzbild erzeugen. Das Interferenzbild hängt von der optischen Orientierung des Kristalls ab. Die hier auftretenden Erscheinungen werden auch als Achsenbilder bezeichnet und lassen sich wie folgt kurz charakterisieren:
Achsenbilder bestehen bei Beleuchtung mit einfarbigem Licht aus zwei Systemen von schwarzen Kurven (Entstehung durch Interferenz). Sie werden als Isogyren (bei Übereinstimmung der Schwingungsrichtung im Präparat mit denen der Polare = Hauptisogyren genannt) und als Isochromaten bezeichnet und bestehen bei einachsigen Kristallen aus einem Balkenkreuz und kreisförmigen Interferenzkurven und bei zwei-



1 Polarisator; *2* vordere Brennebene von *3*; *3* Kondensor; *4* präpariertes Objekt (meist Kristalle senkrecht zur optischen Achse); *5* Beobachtungsobjektiv; *6* hintere Brennebene von *5*; *7* Analysator

Bild 6.79. Prinzip der indirekten (konoskopischen) Beobachtungsmethode

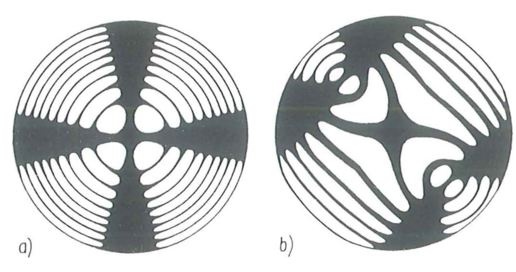


Bild 6.80. Interferenzbilder von einachsigen und zweiachsigen Kristallen bei indirekter Beobachtung in monochromatischem Licht

a) einachsiger; b) zweiachsiger Kristall

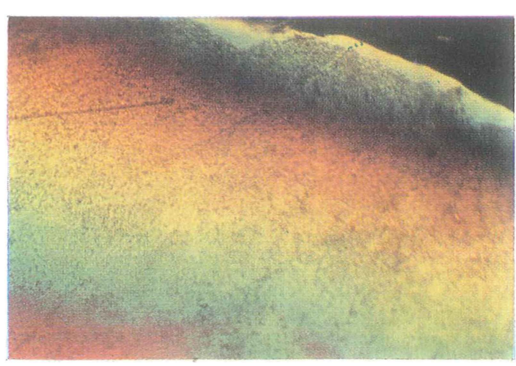
achsigen Kristallen, je nach Lage der Schwingungsrichtung, entweder ebenfalls aus einem Balkenkreuz oder aus einem geöffneten Balkenkreuz (Hyperbeläste) und lemniskatenförmigen Kurven. Bei Verwendung weißen Lichts bleiben die Isogyren dunkel, während die Isochromaten Interferenzfarbfolge zeigen [185] [186] [196].

Im Bild 6.80 sind je ein Achsenbild eines einachsigen Kristalls senkrecht zur optischen Achse und eines zweiachsigen Kristalls senkrecht zur spitzen Bisektrix in Diagonalstellung dargestellt. Außer zur Bestimmung des optischen Charakters des beobachteten Kristalls mit Kompensatoren werden die Interferenzbilder zweiachsiger Kristalle dazu benutzt, den scheinbaren, d.h. den in Luft wirksamen Achsenwinkel $2E$ und daraus den wahren Achsenwinkel $2V$ im Kristall zu bestimmen, wenn man ihn nicht aus den Brechzahlen n_γ, n_β und n_α berechnen kann. Auf die Bestimmung des optischen Charakters wird im Abschnitt 6.1.4.4. eingegangen.

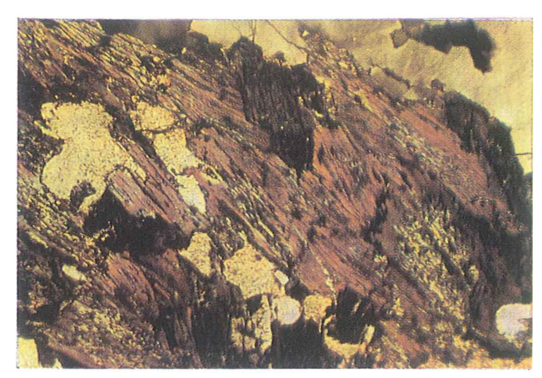
Die hier diskutierten Interferenzbilder können dazu dienen, die Lage der Hauptschwingungsrichtungen in charakteristischen Kristallschnitten ein- und zweiachsiger Kristalle zu bestimmen.

Dispersionserscheinung bei Lichtbrechung, Doppelbrechung und optischen Achsen

Die Brechzahl eines Mediums und i. allg. auch seine Doppelbrechung sind von der Wellenlänge des Lichts abhängig. Die Abhängigkeit kommt im Verlauf der Dispersionskurven zum Ausdruck. Nur wenn die Doppelbrechung für alle Wellenlängen des weißen Lichts gleich ist, erscheinen die Interferenzfarben in der normalen Interferenzfarbfolge. Die meist auftretende Dispersion der Doppelbrechung führt zu Farberscheinungen, die man entweder als über- oder unternormal bezeichnet.



a) Apophyllit (Keil)



b) Pennin im Biotitgranit von Bobritzsch



c) Vesuvian von Poal di Malinverno (Dünnschliff)

Bild 6.81. Anomale Interferenzfarben

Im ersten Fall ist $(n'_\gamma - n'_\alpha)_{\mathrm{rot}} < (n'_\gamma - n'_\alpha)_{\mathrm{viol}}$. Solche Verhältnisse äußern sich durch auffallend kräftige und leuchtende Farben in der 1. Ordnung, während die folgenden Ordnungen rasch zum Weiß höherer Ordnung übergehen. Typisch übernormale Farben zeigt z.B. das Mineral Epidot $Ca_2\,(Fe^{\cdot\cdot}, Al)\,Al_2\,[O|OH|SiO_4|(Si_2O_7)]$.

In der 1. Ordnung tritt ein helles Lichtblau auf, das ohne ein deutliches Weiß der 1. Ordnung sofort in Hellgelb übergeht. Bei $(n'_\gamma - n'_\alpha)_{rot} > (n'_\gamma - n'_\alpha)_{viol}$ ist ein Auftreten von Farben erst in der 2. oder folgenden Ordnung charakteristisch, die allerdings der 1. Ordnung der normalen Folge entsprechen. Dadurch erscheinen stumpfe Farben; violettgraue, bräunliche und fahlgraue Farbtöne sind zu beobachten. Bei bestimmten Mineralen, wie Apophylliten (KCa_4 $[(F(Si_4O_{10})_2]$ $8H_2O$) (Bild 6.81a), entarten sie in helle schmutzigweiße Töne. Ein bekanntes Beispiel eines Minerals mit unternormalen Farben ist der Klinochlor $\{(MgAl_3)\,[(OH)_2|\,AlSi_3O_{10}]\,Mg_3\,(OH)_6\}$, auch Pennin $\{Mg_5\,(Mg, Al)\,[(OH)_8,\ (Al, Si)_3]\,O_{10}\}$ ist hier zu nennen (Bild 6.81b). Bei komplizierten Zusammenhängen in den Dispersionserscheinungen der Doppelbrechung, wenn im sichtbaren Spektrum die Doppelbrechung für eine bestimmte Wellenlänge gleich Null wird, treten sog. anomale Farbfolgen auf, z. B. beim Vesuvian ($Ca_{10}\,(MgFe)_2\,Al_4\,[(OH)_4/(SiO_4)_5/(Si_2O_7)_2]$) (Bild 6.81c). *Ehringhaus* hat diese Erscheinungen quantitativ untersucht. Er konnte zeigen, daß der Kehrwert der relativen Dispersion

$$N = \frac{(n_\gamma - n_\alpha)_D}{(n_\gamma - n_\alpha)_F - (n_\gamma - n_\alpha)_C}$$

ein leicht bestimmbares Charakteristikum für die Dispersion der Doppelbrechung ist. Von besonderem Interesse sind die Dispersionserscheinungen in den Achsenbildern optisch zweiachsiger Kristalle. Sie treten aus Symmetriegründen nur bei den rhombischen, monoklinen und triklinen Kristallen auf. Das Studium ihrer Abhängigkeit von der Wellenlänge λ kann im Polarisationsmikroskop bei indirekter Betrachtung an den besprochenen Interferenzbildern vorgenommen werden. Im rhombischen System z. B. äußert sich die Dispersion in den verschiedenen Werten des Achsenwinkels $2V$ (im Kristall gemessen) für violettes v oder rotes Licht r. In der Literatur werden die Tatsachen durch die Abkürzung $v \gtrless r$ gekennzeichnet. Ist der Wert von $2V$ für violettes Licht größer, so ist am Achsenaustritt eine rote Farbe zu beobachten. Im anderen Fall zeigen die hyperbelförmigen Hauptisogyren in der Diagonalstellung rote und blaue Säume. Weitere Einzelheiten können [185] oder [196] entnommen werden.

Drehende und absorbierende Kristalle

Kristalle, die wie der Quarz in Platten senkrecht zur optischen Achse geschnitten zwischen gekreuzten Polaren keine Dunkelheit, sondern Aufhellung bzw. Interferenzfarben zeigen, haben optisches Drehvermögen. Die Ursache liegt darin, daß derartige Kristalle in Richtung der optischen Achse doppelbrechend sind, wobei die Schwingungsebene des austretenden Lichts noch gedreht ist. Für verschiedene Wellenlängen ergeben sich verschiedene Drehwinkel, für rotes Licht ist er kleiner als für die folgenden Wellenlängen bis zum violetten Teil des Spektrums. Diese Erscheinung nennt man Rotationsdispersion. Man unterscheidet eine Rechtsdrehung von einer Linksdrehung. Demgemäß unterscheidet man rechtsdrehende Kristalle, z. B. Rechtsquarz, von linksdrehenden, z. B. Linksquarz.

Der Betrag der Drehung ist von der Dicke der Kristallplatte abhängig. Unter dem spezifischen Drehvermögen versteht man den Drehwinkel, den eine 1 mm dicke Platte hervorruft. Man bezieht das Drehvermögen auf bestimmte Wellenlängen. Wird der Analysator bei Verwendung weißen Lichts kontinuierlich in einer Richtung gedreht, so werden nebeneinander bestimmte Farben ausgelöscht. Die hindurchgelassenen Farben addieren sich zu Mischfarben derart, wie die Interferenzfarben an einem Quarzkeil. Die auftretenden Farben verlaufen bei gleichem Drehungssinn von Rot über Gelb, Grün und Blau zu Violett. Das Achsenbild solcher Kristalle (Bild 6.82) zeigt ebenfalls Isogyren und Isochromaten, nur sind erstere innerhalb der 1. Ordnung stark geschwächt oder bei dicken Platten ganz unterbrochen, wobei der innerste Ring in der eben angeführten Farbfolge farbig erscheint. Legt man gleich dicke Achsenplatten aufeinander (eine

Bild 6.82. Achseninterferenzbild vom Quarz im weißen Licht (dicke Platte senkrecht zur optischen Achse)

Das farbige Mittelfeld ist auf die Rotationsdispersion des Quarzes zurückzuführen

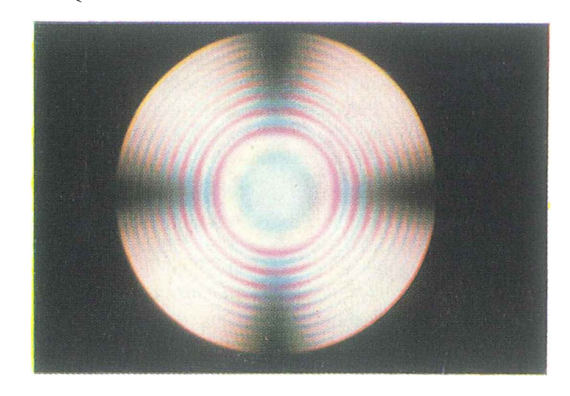




Bild 6.83. Airysche Spiralen, erzeugt durch Übereinanderlegen von rechts- und linksdrehenden Quarzplatten zwischen gekreuzten Polaren

rechtsdrehende und eine linksdrehende), so entstehen die „Airyschen Spiralen" (Bild 6.83). Bei durchsichtigen und schwach absorbierenden Kristallen werden sowohl im direkten als auch im indirekten Strahlengang keine wahrnehmbaren Störungen hervorgerufen, auch wenn das Mineral eine kräftige Eigenfarbe hat. Die Farbe als Ausdruck der Eigenabsorption ist bei anisotropen Körpern richtungsabhängig. Diese Erscheinung bezeichnet man als Pleochroismus. Turmalin ($Na\,Fe_3^{\cdot\cdot}\,Al_6\,[(OH)_{1+3}|(BO_3)_3|Si_6O_{18}]$) und Cordiërit ($Mg_2Al_3\,[AlSi_5O_{18}]$) sind typische Vertreter für pleochroitische Kristalle. Bei einachsigen Kristallen existieren zwei Hauptabsorptionen (Dichroismus) und bei zweiachsigen drei Hauptabsorptionen (Trichroismus), die den Richtungen der Hauptbrechzahlen entsprechen.

Um die Hauptabsorptionen festzustellen, nutzt man die Schwingungsrichtungen aus, d.h., man ermittelt die Auslöschungslagen und beobachtet nach Ausschalten des Analysators jeweils eine

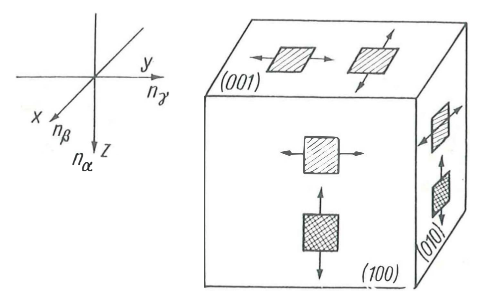


Bild 6.84. Pleochroismus (Trichroismus) am Cordiërit
links optische Orientierung; rechts kristallografische Orientierung; die Farberscheinungen für die verschiedenen Schwingungsrichtungen sind angedeutet

Absorptionskomponente und nach Drehen der Schwingungsrichtung des Polarisators oder des Objekts um 90° die andere Absorptionskomponente. In einem senkrecht dazu orientierten Schnitt kann die dritte Absorptionskomponente beobachtet werden. Von den sechs möglichen Fällen sind je zwei gleich, wie im Bild 6.84 am Cordiërit (nach *Tschermack*) ersichtlich ist. Trennt man diese Absorptionen nicht voneinander, etwa durch Anwendung eines Polarisators, so treten Mischfarben, wie Graugrün, Gelb und Indigoblau, auf. Mit einer Haidingerschen Lupe beobachtet man die Farben nebeneinanderliegend, und mit dem Polarisationsmikroskop beobachtet man sie hintereinander.

In Bestimmungstafeln werden diesbezügliche Hinweise aufgenommen. Bei zunehmender Absorption bis zur Undurchsichtigkeit in Dünnschliffdicke müssen die Objekte im Auflichtpolarisationsmikroskop (Erzmikroskop) untersucht werden.

6.1.4.3. Durchlichtpolarisationsmikroskop

Polare für Mikroskope

Der im Durchlichtpolarisationsmikroskop verwendete Polarisator hat die Aufgabe, das zur Beleuchtung und zur Beobachtung erforderliche natürliche Licht in linear polarisiertes Licht zu verwandeln. Die Änderung dieses Lichts nach Durchgang durch anisotrope Medien, d.h. die durch Doppelbrechung bewirkte Aufspaltung in zwei Lichtkomponenten unterschiedlicher Schwingungsrichtung und Brechzahl, wird mit Hilfe des Analysators festgestellt. Die Ursachen zu den Änderungen sind darin zu suchen, daß sich die Komponenten nach Verlassen des Mediums überlagern und zu einer resultierenden Lichtschwingung zusammensetzen. In modernen Polarisationsmikroskopen werden heute meist Filterpolare benutzt. Sie sind wesentlich billiger als Kalkspatprismen und haben wegen ihres geringen Platzbedarfs konstruktive Vorteile.

Eine Lichtbeschränkung in der Beleuchtung und bei der Beobachtungsapertur findet ebenfalls nicht statt. Praktisch sind sie für alle zu beobachtenden polarisationsoptischen Erscheinungen brauchbar.

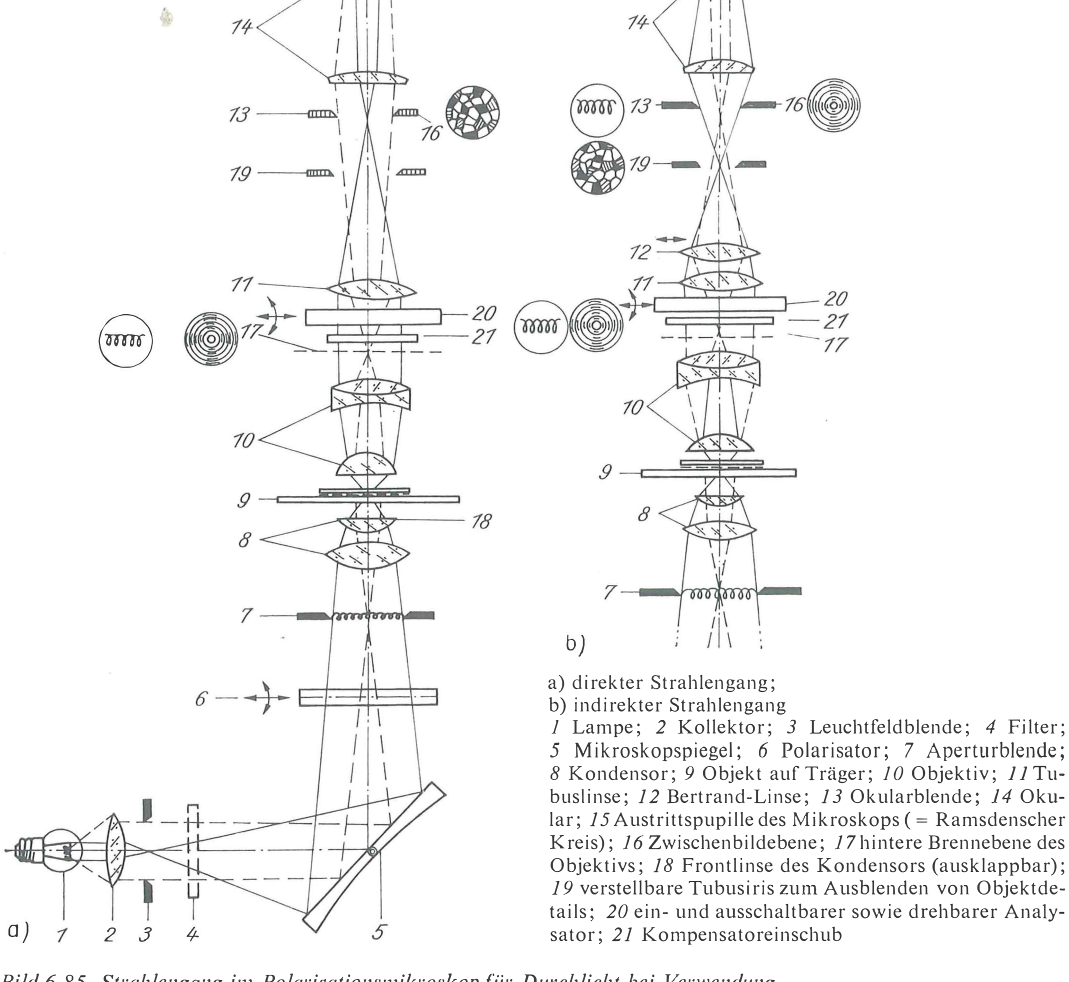
Aufbau des Polarisationsmikroskops

Mit der Schaffung des Polarisationsmikroskops sind Namen, wie *Rosenbusch*, *Wülfing*, *Czapski*, *Berek*, *Ehringhaus*, *Becke*, *Winchell*, *Duparc*,

Drescher-Kaden einerseits und *Leitz*, *Winkel*, *Zeiß* und *Fuess* andererseits, eng verbunden. Es ist nicht nur Beobachtungs-, sondern auch Meßinstrument. Das stellt hohe Anforderungen an den feinmechanisch-optischen Aufbau hinsichtlich Justierung und Zentrierung sowie Verwendung qualitativ hochwertiger Optik im Hinblick auf Abbildungsgüte und polarisationsoptische Eigenschaften.

Dem Ausbau eines Polarisationsmikroskops mit Zusatzgeräten für neuere Untersuchungsmethoden, wie das Phasenkontrastverfahren, verschiedene Verfahren der Interferenzmikroskopie, die Fluoreszenzmikroskopie, die Hochtemperatur- und Tieftemperaturmikroskopie und die Untersuchungsmethodik der Phasenbestimmung im weitesten Sinne, muß mehr denn je Rechnung getragen werden. Auch der allgemeine Bedienungskomfort und die zweckmäßige Verbindung für Verfahren der Durchlicht- und Auflichtmikroskopie sind dabei zu berücksichtigen.

Der schematisch-optische Aufbau eines Polarisationsmikroskops für Durchlichtbeobachtungen wird anhand von zwei Skizzen (Bilder 6.85a und b) dargestellt. Der direkte Strahlengang in a) bezieht sich auf die Abbildung der Objektebene



a) direkter Strahlengang;
b) indirekter Strahlengang
1 Lampe; *2* Kollektor; *3* Leuchtfeldblende; *4* Filter; *5* Mikroskopspiegel; *6* Polarisator; *7* Aperturblende; *8* Kondensor; *9* Objekt auf Träger; *10* Objektiv; *11* Tubuslinse; *12* Bertrand-Linse; *13* Okularblende; *14* Okular; *15* Austrittspupille des Mikroskops (= Ramsdenscher Kreis); *16* Zwischenbildebene; *17* hintere Brennebene des Objektivs; *18* Frontlinse des Kondensors (ausklappbar); *19* verstellbare Tubusiris zum Ausblenden von Objektdetails; *20* ein- und ausschaltbarer sowie drehbarer Analysator; *21* Kompensatoreinschub

Bild 6.85. Strahlengang im Polarisationsmikroskop für Durchlicht bei Verwendung des Köhlerschen Beleuchtungsprinzips

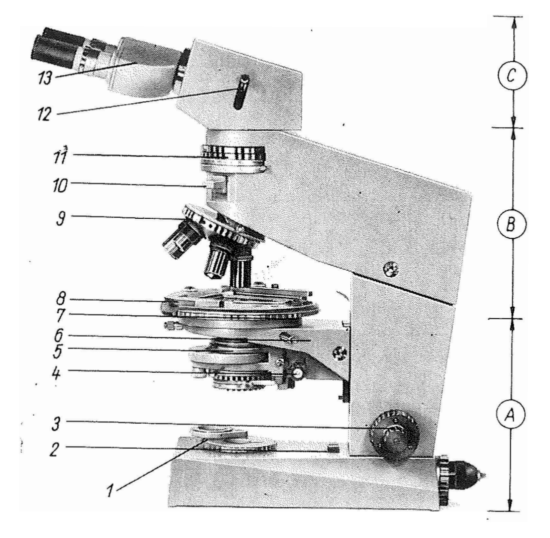


Bild 6.86. Polarisationsmikroskop für Durchlichtbeobachtung AMPLIVAL pol d

A Grundstativ mit eingebauter Leuchte
1 Lichtaustrittsöffnung mit Großfeldlinse; *2* Leuchtfeldblendeneinstellung; *3* koaxialer Antrieb; *4* Höhenverstellknopf für den Beleuchtungsapparat; *5* Kondensor; *6* Tischträger; *7* Drehtisch; *8* Objektführer

B Tubusträger für Durchlichtbeobachtung
9 zentrierbarer fünffacher Objektivrevolver; *10* Einschuböffnung für Kompensatoren; *11* Analysatoreinrichtung

C Winkeltubus mit Bertrand-Linse und binokularem Ansatz
12 Handhabe zum Ein- und Ausschalten der Bertrand-Linse; *13* binokularer Beobachtungsansatz

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

und der konjugierten Ebenen, der andere, indirekte Strahlengang auf die Abbildung der Aperturblende.

Beim indirekten Strahlengang wird die Lampenwendel in den Pupillenebenen abgebildet; da diese Ebenen beobachtet werden, muß die Struktur der Lampenwendel durch Einschalten einer Mattscheibe oder durch Mattierung des Lampenkolbens unschädlich gemacht werden. An den Seiten der Skizzen sind die in den genannten Ebenen liegenden Bilder entsprechend angedeutet.

Da es nicht möglich ist, alle heute gängigen Typen zu behandeln, soll hier stellvertretend für ein modernes Polarisationsmikroskop das AMPLIVAL pol des VEB Carl Zeiss JENA, näher besprochen werden. Es ist nach dem bewährten Baukastenprinzip konstruiert worden (Bild 6.86). Es besteht aus dem Grundstativ *A*, dem Tubusträger *B* und dem schrägen Beobachtungstubus *C* und wird grundsätzlich von der Tischseite benutzt. Man kann sowohl monokular als auch binokular beobachten.

Die Beleuchtungsführung erfolgt nach dem Köhlerschen Prinzip. Die Leuchtfeldblende *2* ist im Stativfuß eingebaut; ihre Einstellung kann von außen her vorgenommen werden. Der Beleuchtungsapparat *5* ist in der Höhe verstellbar; eine Großfeldlinse *1* dient zum Ausleuchten großer Sehfelder bei schwachen Vergrößerungen. Der mit Gradteilung versehene Mikroskoptisch *7* ist wälzgelagert und sitzt in dem Tischträger *6*, der mit einer Klemme am Stativ befestigt wird. Die Scharfstellung des Objekts erfolgt über einen koaxial gelagerten Antrieb *3*, dessen Knöpfe tief liegen und für den Benutzer bequem zugänglich sind. Zur seitlichen Verschiebung des Präparats wird ein Objektführer *8* benutzt, der in keiner Stellung das Umschlagen des Objektivs beim Vergrößerungswechsel stört. Die planachromatisch und auf unendliche Bildweite korrigierten Objektive sind in einen zentrierbaren Revolver *9* eingeschraubt. Zum Erzeugen des Zwischenbilds in der Okularbildebene wird eine Tubuslinse verwendet. Oberhalb des Objektivrevolvers befindet sich der Einschub *10* für die Kompensatoren $\lambda/4$, λ, den Quarzkeil und verschiedene Meßkompensatoren. Der drehbare Analysator *11* wird mit einem Rändelring aus- und eingeschaltet. Die Bertrand-Linse *12* ist ebenfalls ein- und ausschaltbar und darüber hinaus fokussierbar eingerichtet. Eine verstellbare Zwischenblende dient dazu, Einzelkristalle, z. B. aus einem heterogenen Schliff, für die indirekte Beobachtung ausblenden zu können.

Die empfohlene Objektivkombination ist:

6,3 × /0,12 ∞ /0,17; 12,5 × /0,25 ∞ /0,17;
25 × /0,50 ∞ /0,17; 63 × /0,80 ∞ /0,17;
HI 100 × /1,30 ∞ /0,17.

Mit den verwendeten Kompensationsokularen werden Vergrößerungsstufen zwischen 50 × und 1250 × erreicht.

Die Apertur des achromatisch-aplanatischen Kondensors beträgt ohne Frontlinse 0,8 und mit Frontlinse 1,3. Die ausgezeichnete Korrektion des Kondensors ist nicht nur im Hinblick auf eine gute Abbildung im Mikroskop fördernd, sondern auch für die Ausleuchtung der Austrittspupille des Objektivs wichtig.

Nur so kann die volle numerische Apertur des Objektivs, z. B. bei Messungen von Achsenwinkeln, auch genutzt werden. Der Polarisationskondensor ist durch Einsetzen einer Spezialblende

bzw. eines variablen Spalts oder eines Gitters auch für Beobachtungen nach dem Phasenkontrastverfahren (s. Abschn. 6.1.2.) und verschiedenen Verfahren der Interferenzmikroskopie (s. Abschn. 6.1.3.) verwendbar. Der Strahlengang des AMPLIVAL pol d wird im Bild 6.87 gezeigt.
Im Bild 6.88 ist der Aufbau des Polarisationsmikroskops AMPLIVAL pol d mit der Interphakoeinrichtung dargestellt. Der Einsatz dieses Geräts wird bei der Ermittlung von Brechzahlen besprochen.
Polarisationsmikroskope sind besonders sorgfältig zu behandeln und vor Kälte, Wärme und Feuchtigkeit zu schützen.

6.1.4.4. Messungen mit dem Polarisationsmikroskop

Messung von Winkeln, Längen, Dicken und Flächen

Messungen von Winkeln werden besonders an Kristallen durchgeführt. Sie sind nicht nur zu ihrer Diagnose, sondern auch zum Anfertigen von Zeichnungen erforderlich. Winkel werden

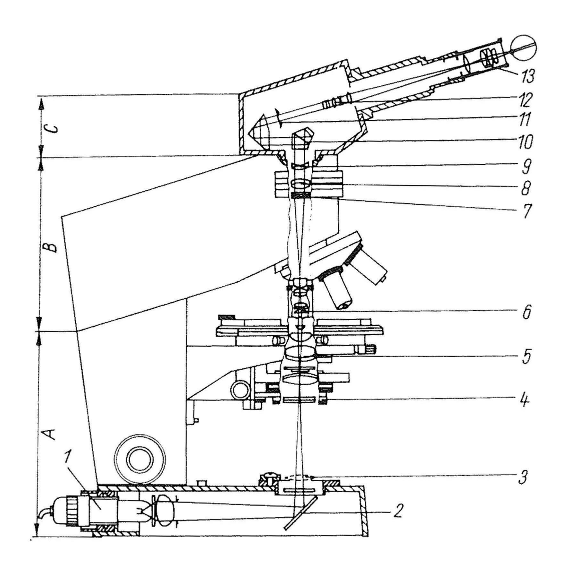


Bild 6.87. Schematische Darstellung des Strahlengangs im Durchlichtpolarisationsmikroskop AMPLIVAL pol d
A Grundstativ mit eingebauter Leuchte *1*; *2* Umlenkspiegel; *3* Großfeldlinse; *4* Polarisator; *5* Kondensor
B Tubusträger:
6 Objektiv; *7* Analysator; *8* Tubuslinse; *9* Bildversetzungslinse
C Winkeltubus:
10 Umlenksystem; *11* Zwischenbildebene mit verstellbarer Irisblende; *12* Bertrand-Linse mit Bildversetzungslinse; *13* Okular

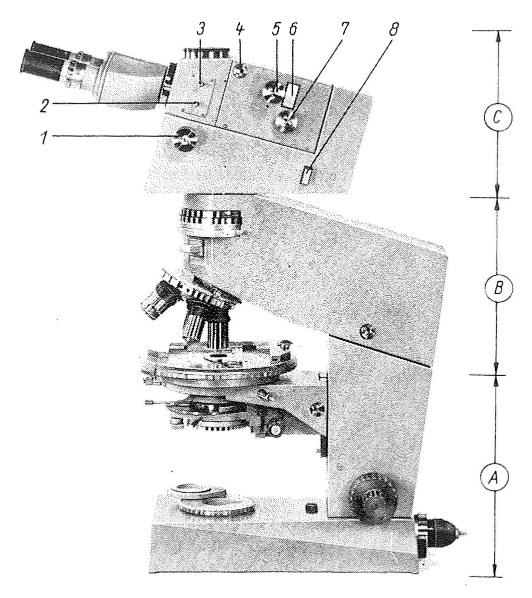


Bild 6.88. Polarisationsmikroskop AMPLIVAL pol d mit Interphakoeinrichtung
A Grundstativ mit eingebauter Leuchte (s. Bild 6.86); *B* Tubusträger; *C* Interphakoeinrichtung
1 Knopf zur Pupillenfokussierung; *2* Zugstange für Bertrand-Linse; *3* Zugstange für Umschaltprisma; *4* Klemmschraube für Einsatz In; *5* Meßtrommel für Phasenschieber; *6* Aufnahmeschlitz für Drehkeil und Ringblenden; *7* Knopf zur Einstellung vertikaler Interferenzstreifen; *8* Aufnahmeschlitz für die Halbschattenplatte
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

z. B. von Kristallflächen oder von Kristallkanten oder auch von Spaltrissen miteinander oder zu Kanten bzw. zu Flächen gebildet. Winkelmessungen sind grundsätzlich nicht nur im direkten, sondern auch im indirekten Strahlengang möglich. Man verwendet dazu spezielle Zusatzgeräte, wie Universaldrehtisch oder Spindeldrehtisch und auch Tischgoniometer, die auf dem Mikroskoptisch aufgesetzt werden. Hier sollen nur die Methoden besprochen werden, die mit dem Mikroskoptisch und seiner Gradteilung durchführbar sind. Zu Winkelmessungen wird in Verbindung mit dem Drehtisch ein Fadenkreuzokular verwendet. Zu dessen Fäden werden die Schenkel des zu messenden Winkels jeweils nach Drehen des Tisches parallelgestellt.
Die Form der Kristallkanten, der Spaltrisse usw. beeinflußt die Meßresultate. Mittelwerte sind aus mindestens zehn Messungen zu bilden.
Messungen von Längen werden in der Polarisationsmikroskopie in derselben Art vorgenommen wie in der gewöhnlichen Mikroskopie.

Einzelheiten hierzu sind im Abschn. 9. behandelt. Zu Dickenmessungen, die besonders in der Polarisationsmikroskopie viel durchzuführen sind, sind einige Bemerkungen erforderlich. Eine bekannte Methode geht auf den *Duc de Chaulnes* zurück, die dieser bei bekannter Objektdicke zur Brechzahlbestimmung an Kristallen benutzte. Man kann bei Kenntnis der Brechzahl auch auf die Dicke schließen.

Bekanntlich erfahren Punkte an der Unterseite einer Kristallplatte eine von der Brechzahl des Materials abhängige Bildhebung. Die scheinbare axiale Bildverlagerung ist zu messen und gibt mit dem Brechungsgesetz folgenden Zusammenhang:

$$\frac{d}{d'} = \frac{n'}{n''}; \quad d = d' \frac{n'}{n''}.$$

Hierin bedeuten d die wahre Plattendicke und d' die gemessene scheinbare, n' die Brechzahl der Kristallplatte und n'' die des Mediums zwischen Platte und Frontlinse des Objektivs (bei Luft $n'' = 1$ und bei Immersionen $n'' = 1{,}515$). Also ist d nach Messung von d' zu ermitteln. Mit einem kalibrierten Feintrieb am Mikroskop wird d' ermittelt, indem man nacheinander auf die Oberfläche und die Unterfläche der Kristallplatte einstellt. Vorteilhaft ist die Verwendung monochromatischen Lichts. *Rittmann* [185] empfiehlt bei Verwendung loser Kristalle die Einbettung in Wasser, dem feine Partikel eines unlöslichen Farbstoffs beigefügt sind. Die Farbstoffpartikel setzen sich auf den Kristallflächen ab und erleichtern dadurch das Einstellen auf die Kristalloberflächen.

Fehlerquellen bieten die nicht hinreichend genau bekannte Brechzahl des Kristalls, die Unvollkommenheit der Feintriebeinstellvorrichtung am Mikroskop und die Schärfentiefe der Optik.

Bei Dickenmessung ist darauf zu achten, daß der Feintrieb nur in einer Richtung benutzt wird und das Mikroskop gut temperiert sein soll.

Flächenmessungen an kristallinen bzw. anderen anisotropen homogenen und heterogenen Objekten finden in der Polarisationsmikroskopie seit geraumer Zeit sehr großes Interesse. Sie lassen besonders in ihren modernen Varianten eine umfangreiche Anwendung in verschiedenen Zweigen der Wissenschaft und Technik erwarten. Nicht nur körnige Präparate, sondern auch Ausscheidungen in verschiedenen Grundmassen sind hierfür geeignet. Eine entsprechend einwandfreie Präparation ist allerdings für derartige Versuche Voraussetzung.

Messung im direkten Strahlengang

Messung von Brechzahlen

Die Messung der Brechzahl unter dem Mikroskop gewinnt auch heute noch an Bedeutung. Verschiedene hierfür empfohlene Methoden ergaben schon Genauigkeiten bis auf wenige Einheiten in der vierten Stelle hinter dem Komma.

Tafel 6.2. Immersionsflüssigkeiten (nach Burri, Rinne, Berek und Hartshorne, Stuart)

	n_D
Methylalkohol	1,33
Wasser	1,331
Äthyläther	1,352
Azeton	1,359
Äthylalkohol	1,362
Hexan	1,375
Heptan	1,387
Amylalkohol	1,40
Äthylbromid	1,424
Chloroform	1,444
Petroleum	1,45
Lavendelöl	1,461
Tetrachlorkohlenstoff	1,466
Terpentin	1,472
Olivenöl	1,476
Rizinusöl	1,48
Xylol	1,495
Benzol	1,501
Zedernholzöl	1,515
Monochlorbenzol	1,527
Fenchelöl	1,538
Nelkenöl	1,544
Anisöl	1,55
Nitrobenzol	1,553
Dimethylanilin	1,559
Monobrombenzol	1,561
Orthotoluidin	1,572
Anilin	1,586
Bromoform	1,589
Bittermandelöl	1,60
Ceylon-Zimtöl	1,619
Monojodbenzol	1,621
Schwefelkohlenstoff	1,628
α-Monochlornaphthalin	1,639
α-Monobromnaphthalin	1,656
α-Monobromnaphthalin + Methylenjodid	1,70
K-Mercurichlorid (wäß.)	1,717
Methylenjodid	1,744
Methylenjodid + Schwefel (gesätt.)	1,778
Methylenjodid + Schwefel + Jodide des Sn, As, Sb	1,74 / 1,87
Phenyldijodarsin	1,84

Die Ermittlung dieser Zahlenangaben an mikroskopisch kleinen Objekten führt zu einem wichtigen Erkennungsmerkmal organischer und anorganischer, kristallisierter, u. U. auch amorpher Körper. Die meisten Verfahren dieser Art beruhen auf dem Prinzip der Immersionsmethode. Hinsichtlich ihrer Anwendung auf isotrope Objekte wird auf die Abschnitte 6.1.2. und 6.1.3. verwiesen. Für diese Methode geeignete Immersionsflüssigkeiten sind in den Tafeln 6.2. und 6.3. zusammengestellt worden.

Bei der Untersuchung anisotroper Körper müssen die Hauptschwingungsrichtungen und die ihnen zugeordneten Hauptbrechzahlen ermittelt werden. Dies ist an orientierten Kristallpräparaten möglich. Zum Bestimmen optisch einachsiger Kristalle genügt dabei ein Schnitt parallel zur optischen Achse. In dieser Schnittlage können n_ω und n_ε gemessen werden, während in allen anderen Schnitten neben dem variablen n'_ε stets die Hauptbrechzahl n_ω bestimmbar ist. Zum Messen der drei Hauptbrechzahlen optisch zweiachsiger Kristalle sind mindestens zwei definierte Kristallschnitte erforderlich. In einem Schnitt senkrecht zu einer der drei Hauptschwingungsrichtungen lassen sich die den beiden anderen Hauptschwingungsrichtungen entsprechenden Hauptbrechzahlen ermitteln, z.B. können in Schnitten senkrecht zu der n_α entsprechenden Schwingungsrichtung n_β und n_γ gemessen werden. Dabei muß die Schwingungsebene des den Kristall durchsetzenden linear polarisierten Lichts in jeweils einer der beiden möglichen Hauptschwingungsrichtungen liegen. Das wird erreicht, indem man die interessierende Schwingungsrichtung parallel zur Schwingungsrichtung des Polarisators stellt. Die zweite Brechzahl wird dann gemessen, nachdem man den Kristall mit dem Drehtisch um 90° gedreht und damit die zugeordnete Schwingungsrichtung parallel zum Polarisator eingestellt hat. Das Aussuchen orientierter Schnitte oder Körner bereitet gewisse Schwierigkeiten; einmal dann, wenn Bruchstücke nach Spaltflächen orientiert sind, die schief zu den gewünschten Hauptschwingungsrichtungen liegen, und andererseits dadurch, daß eine Orientierungsmöglichkeit der Probe nur schwer mit einem heizbaren Objektträger in gemeinsame Funktion zu bringen ist. *Emmons* [187] hat vorgeschlagen, für die Orientierung einen fünfachsigen Universaldrehtisch einzusetzen, in dem zwischen den Segmenten eine Warmwasserzelle eingeschaltet wird. *Leitz* hat hierfür eine elektrisch geheizte Vorrichtung für U-Tische in den Handel gebracht. Bei Einstellungsschwierigkeiten können bei Bekanntsein einer Hauptbrechzahl oder eines Zwischenwerts

Tafel 6.3. Immersionsflüssigkeiten (nach Emmons und Berek)

Name der Immersionsflüssigkeit	n bei 18 °C für 656 nm (C)	589 nm (D)	486 nm (F)	Temperaturkoeffizient dn/dt
Monochloressigsäureäthylester	1,420	1,423	1,428	−0,00049
Dichloressigsäureäthylester		1,434		−0,00047
Trimethylenchlorid	1,446	1,449	1,454	−0,00049
Isoamylsulfid		1,454		−0,00045
Methylrhodanid	1,466	1,469	1,477	−0,00054
Brenzschleimsäuremethylester	1,483	1,488	1,500	−0,00045
Pentachloräthan		1,504		−0,00049
Propylenbromid	1,516	1,520	1,528	−0,00054
Äthylenbromid		1,539		−0,00056
O-Nitrotoluol	1,541	1,547	1,564	−0,00049
Nitrobenzol		1,553		−0,00048
O-Toluidin	1,567	1,573	1,589	−0,00051
Anilin		1,587		−0,00053
Bromoform	1,593	1,598	1,611	−0,00060
Jodbenzol	1,613	1,620	1,638	−0,00055
s-Tetrabromäthan		1,639		−0,00053
Phenylisorhodanid	1,641	1,651	1,677	−0,00056
o-Bromjodbenzol	1,656	1,664	1,682	−0,00052
α-Jodnaphthalin + α-Bromnaphthalin	1,669	1,678	1,702	−0,00047
α-Jodnaphthalin	1,693	1,702	1,730	−0,00047
Methylenjodid	1,732	1,742	1,769	−0,00067

und eines Hilfswinkels die gewünschten Hauptbrechzahlen berechnet werden. *Emmons* gibt dafür ein Nomogramm. Die Bestimmung der Brechzahl der Einbettungsflüssigkeit muß dann nach der Totalreflexionsmethode erfolgen, was jedoch zu weniger genauen Werten führt. Erfahrungen mit dieser Methode hat *P. J. Beger* [184] gesammelt.
S. Tsuboi [206] und *E. D. Taylor* [204] haben für wichtige spaltbare gesteinsbildende Mineralien die Brechzahlen berechnet, die sich ergeben, wenn spaltebenenorientierte Präparate zur Bestimmung benutzt werden. Somit ist auch eine Diagnose mit den obliegenden Verhältnissen möglich. Zur Bestimmung bei neu synthetisierten mikroskopisch kleinen Kristallen werden die erwähnten Methoden noch komplizierter, vor allem, wenn die Kristalle temperaturempfindlich sind oder bei niedrigeren Temperaturen untersucht werden müssen. Zu diesen Methoden liegen Ansätze vor, die von *H. H. Seyfarth* und *G. Rüprich* [202] veröffentlicht wurden.

Bestimmung der Doppelbrechung

Bei der Besprechung der Fresnelschen Intensitätsgleichung trat ein Glied auf, das dem durch Doppelbrechung erzeugten Gangunterschied Rechnung trägt. Dieser wird nach

$$R'_{(\lambda)} = \frac{d}{\lambda}\,(n'_\gamma - n'_\alpha) \quad \text{in Wellenlängen}$$

bestimmt.
Darin gibt d die Dicke des Präparats, $(n'_\gamma - n'_\alpha)$ den Betrag der Doppelbrechung und λ die Wellenlänge des Lichts, das zur Messung benutzt wird, an. Je nach Orientierung des Objekts ist die Doppelbrechung unterschiedlich groß. Von Interesse sind die den Hauptbrechzahlen n_α, n_β, n_γ bzw. n_ω und n_ε zugeordneten Hauptdoppelbrechungen $n_\gamma - n_\alpha$, $n_\beta - n_\alpha$, $n_\gamma - n_\beta$ bzw. $n_\varepsilon - n_\omega$ und $n_\omega - n_\varepsilon$. Um diese ermitteln zu können, müssen zunächst die Richtungen der Hauptbrechzahlen bestimmt werden. Man bestimmt die Schwingungsrichtungen der den einzelnen Brechzahlen zuzuordnenden Richtungen im Kristall mit Kompensatoren.
Meist stehen bei dem zu untersuchenden Objekt keine Hauptschnitte zur Verfügung; dann ist nur eine Bestimmung der relativen Lage möglich, d.h., man kann nur festlegen, welche der beiden vorliegenden Richtungen der schnelleren (n'_α) und welche der langsameren Welle (n'_γ) entspricht. Dazu verwendet man den Kompensator λ oder Rot 1. Ordnung (Gipsplättchen oder auch das $\lambda/4$-Plättchen. Zunächst wird die Kristallplatte im Präparat bei gekreuzten Polaren durch Drehen des Mikroskoptisches in die Auslöschungsstellung (Dunkelstellung) gebracht. Dann wird das Objekt wiederum mit dem Drehtisch in die Diagonal- oder 45°-Stellung gedreht, so daß es sich in maximaler Aufhellung befindet. In dieser Stellung wird der Kompensator λ (= Rot I) in die über dem Objektiv im Tubus vorgesehene Einschuböffnung eingeführt. Es ergeben sich in bezug auf die Schwingungsrichtungen im Kristallpräparat und im Kompensator zwei Fälle:

1. n'_γ (Kristall) parallel n_γ (Kompensator) und n'_α (Kristall) parallel n_α (Kompensator),
2. n'_γ (Kristall) parallel n_α (Kompensator) und n'_α (Kristall) parallel n_γ (Kompensator).

In beiden Fällen ändert sich der Gangunterschied. Im ersten Fall tritt eine Vergrößerung des Gangunterschieds ein (Additionsstellung), wodurch sich die Interferenzfarbe ändert; die Farbe steigt. Im zweiten Fall tritt eine Verringerung des Gangunterschieds (Subtraktionsstellung) ein; die Farbe fällt. Für die Zuordnung der Farbänderung zum Gangunterschied benutzt man zweckmäßig ein Farbdiagramm der Interferenzfarben, z.B. nach *Michel-Lévy*, das im Bild 6.89 dargestellt ist.
Geht man z.B. von Rot I (R = 551 nm) aus (Bild 6.90a), so tritt bei Zunahme des Gangunterschied um 113 nm ein blauer Farbton (Bild 6.90b) und beim Fallen der Farben um den gleichen Gangunterschied ein gelber Farbton (Bild 6.90c) auf. Im Bild 6.90d wird die Erscheinung bei Verwendung eines Kompensators λ in Subtraktionsstellung gezeigt. Schwierigkeiten bereitet diese Bestimmungsmethode, wenn sich die Ausgangsfarben des Objekts in höheren Ordnungen bewegen. In diesen Fällen führt der Quarzkeilkompensator häufig zum Ziel, mit dem der Gangunterschied kontinuierlich um einige Ordnungen geändert werden kann. Da die Bestimmung der Schwingungsrichtungen der Hauptzahlen nur an orientierten Schnitten möglich ist, muß man eventuell durch Spaltbarkeiten, morphologische Erkennungsmerkmale und unter Zuhilfenahme indirekter Methoden entsprechende Schnitte im Präparat aussuchen.
Aus der Gleichung für den Gangunterschied läßt sich, wenn die Dicke des Präparats (s. Abschnitt 6.1.4.4.) und die Größe des Gangunterschieds ermittelt wurden, die Doppelbrechung berechnen. Die Messung von Gangunterschieden erfolgt mit Meßkompensatoren. Man unterscheidet Kompensatoren, die in den Kompensatorschlitz im

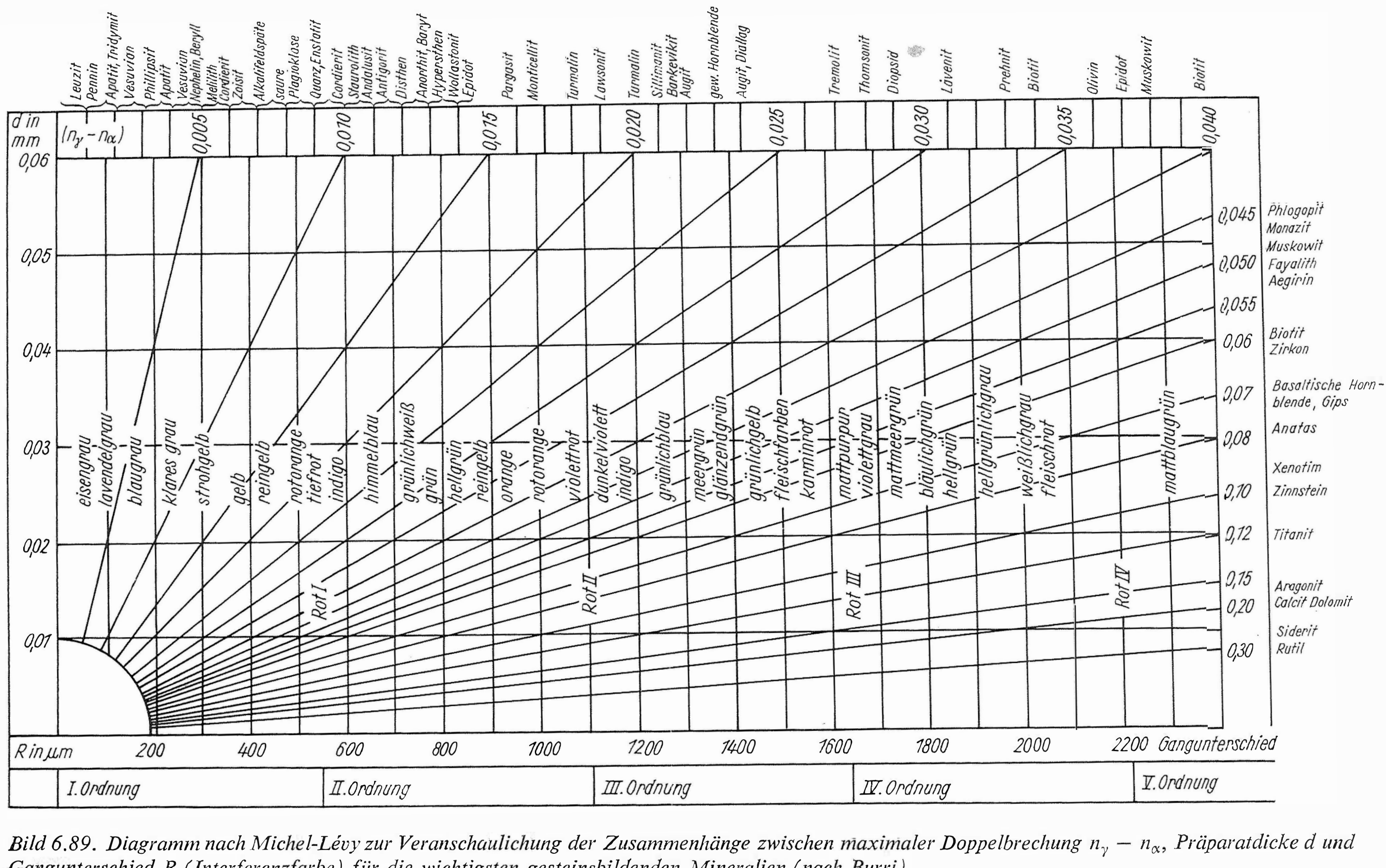
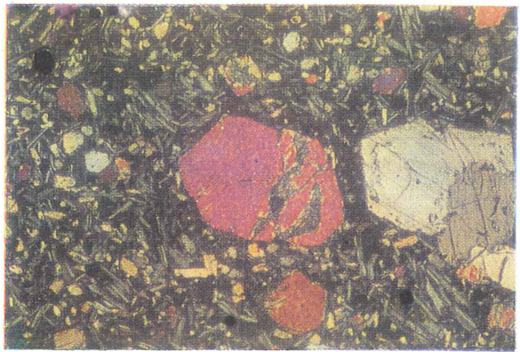
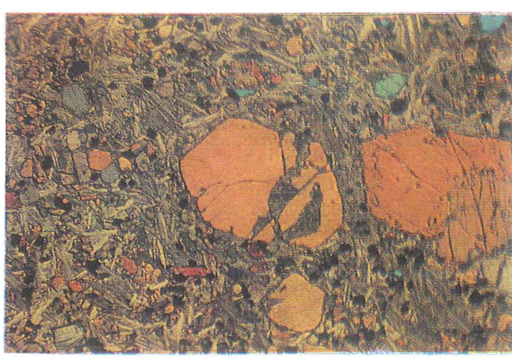


Bild 6.89. Diagramm nach Michel-Lévy zur Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen maximaler Doppelbrechung $n_\gamma - n_\alpha$, Präparatdicke d und Gangunterschied R (Interferenzfarbe) für die wichtigsten gesteinsbildenden Mineralien (nach Burri)



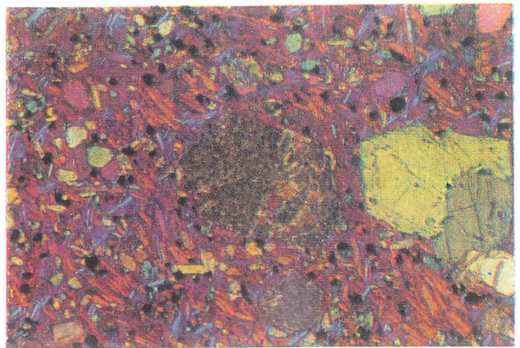
a) gekreuzte Polarisatoren (= P +), der große sechsseitig begrenzte Olivinkristall zeigt die typischen rotvioletten blauvioletten Farben;



c) P + und $\lambda/4$-Kompensator in Subtraktionsstellung; der Olivinkristall zeigt jetzt eine Veränderung der Farbe nach gelb-orange (geringere Ordnung);



b) P + und $\lambda/4$-Kompensator in Additionsstellung; der Olivinkristall zeigt eine Veränderung der Farbe nach blau (höhere Ordnung);



d) P + und λ-Kompensator in Subtraktionsstellung; der Olivinkristall zeigt eine Veränderung der Farbe zu geringer Ordnung hellgrau

Bild 6.90. Beispiele zur Interferenzfarbenveränderung durch Kompensatoren (in Additions- und Subtraktionsstellung)

Objekt: Olivin im Feldspatbasalt vom Oelberg/Siebengebirge (M 50 : 1)

Mikroskoptubus oberhalb des Objektivs eingeschoben werden, und Kompensatoren mit Meßskale, die beim Meßprozeß zugleich mit dem Objekt und seinem Interferenzbild beobachtet werden müssen und die in einem Spezialokular angeordnet sind oder in dieses wie beim Wrightschen Okular (Bild 6.91) in einen Schlitz, der mit der Zwischenbildebene koordiniert ist, eingeschoben werden

Zwei der bekanntesten und am meisten verwendeten Meßkompensatoren, die zu der ersten Art gehören, sind der nach *Berek*, ein Kalkspatkompensator, und der Kombinations-Kalkspat- (bzw. Quarz-) Plattenkompensator, nach *Ehringhaus*. Ersterer besteht aus einer senkrecht zur optischen Achse geschnittenen Platte, die um eine Richtung senkrecht zu ihr gekippt werden kann. Die Kippwinkel werden mit einem Nonius an einer Gradteilung abgelesen. Der mit ihm gemessene Gangunterschied beträgt in Wellenlängen gemessen

$$R'(\lambda) = n_\omega d/\lambda \times \left(\sqrt{1 - \sin^2 i/n_\omega^2} - \sqrt{1 - \sin^2 i/n_\varepsilon^2}\right).$$

d Plattendicke
λ Wellenlänge
n_ω, n_ε Hauptbrechzahlen des Kalkspats
i Kippwinkel.

Für den praktischen Gebrauch wurde diese Gleichung durch Einführung einer Kompensatorkonstanten der Verwendung von Tafeln angepaßt, die dem Kompensator beigegeben werden.

Der Kompensator nach *Ehringhaus* (Bild 6.92) besteht aus zwei gleich dicken planparallelen und parallel zur optischen Achse geschliffenen Kalkspat- oder Quarzplatten, die in Subtrak-

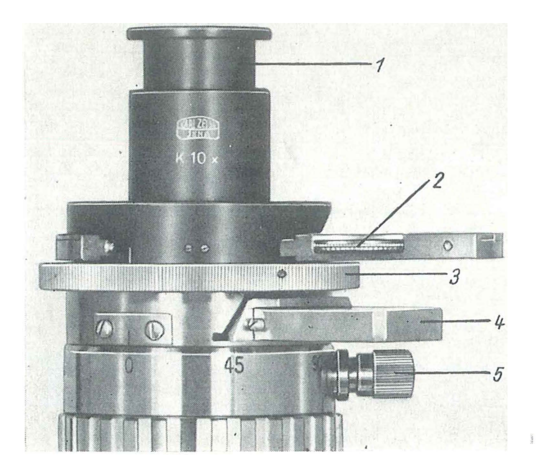


Bild 6.91. Wrightsches Okular

1 stellbares Okular K 10 × ; *2* drehbarer Analysator auf Schieber; *3* Stellring für Irisblende; *4* Kompensator, auf Schlitten im Tubus eingeschoben; *5* Fixierschraube des Okulars am Mikroskoptubus

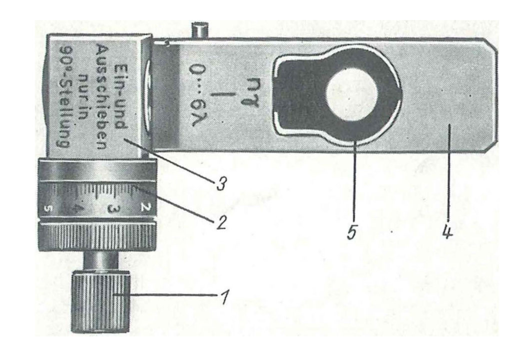


Bild 6.92. Meßkompensator nach Ehringhaus

1 Handhabe zur Meßtrommel; *2* Meßtrommel mit Nonius; *3* Getriebeteil; *4* Schlittenteil; *5* Kompensatorteil (kippbare Kristallplatte)

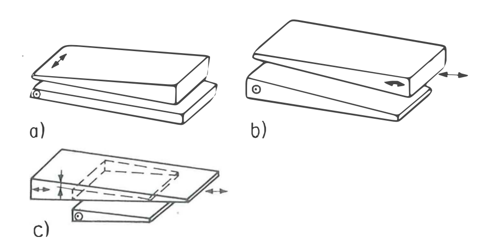


Bild 6.93. Prinzipskizzen von Meßkompensatoren

a) Quarzkombinationskeil nach Wright;
b) Babinet-Kompensator;
c) Soleil-Babinet-Keilkompensator

Die Pfeile ↔ geben die Richtungen der optischen Achse an, ⊙ die dazu senkrechten Richtungen

tionsstellung miteinander verkittet sind. Beim Messen wird diese Kombinationsplatte um die Richtung der optischen Achse so lange gekippt, bis der Gangunterschied des zu messenden Objekts gerade kompensiert wird, das Objekt (bei kleiner Beleuchtungsapertur) also dunkel erscheint. Die zugehörigen Neigungswinkel werden auch hier mit einem Nonius an einer Gradteilung abgelesen. Die Gleichung, nach der der Gangunterschied berechnet wird, lautet:

$$R'(\lambda) = n_\varepsilon d/\lambda \times \left(\sqrt{1 - \sin^2 i/n_\varepsilon^2} - \sqrt{1 - \sin^2 i/n_\omega^2}\right).$$

Auch mit diesem Kompensatortyp werden für den praktischen Gebrauch Tafeln verwendet. Die mit ihm zu kompensierenden Gangunterschiede liegen bei Verwendung von Kalkspat bei $\approx 130\lambda$. Es gibt auch Meßkompensatoren, bei denen Keile oder Platten bestimmter Orientierung mit einer Meßspindel gegeneinander verschoben werden. Das sind z.B. der Quarzkombinationskeil nach *Wright*, der Babinet-Kompensator und der Soleil-Babinet-Kompensator. Prinzipskizzen der genannten Kompensatoren sind im Bild 6.93 dargestellt.

Erwähnt werden soll schließlich noch der elliptische Kompensator nach *De Sénarmont*. Bei diesem handelt es sich um einen Glimmerkompensator, der für Messungen kleiner Gangunterschiede bis zu 1 λ vorgesehen ist. Es wird eine azimutal drehbare Glimmerplatte mit $R = \lambda/4$ verwendet. Da dieser Kompensator zur Feststellung des Azimuts der resultierenden Welle einen drehbaren Analysator benötigt, wird er oft in Verbindung mit einem Wrightschen Okular angewendet. Der Gangunterschied berechnet sich aus der Gleichung

$$R = \frac{\beta}{180}\,\lambda.$$

Hierin bedeuten β Drehwinkel des Analysators und λ Wellenlänge des Lichts, die dem λ der Kompensatorplatte entspricht. Nach *Brace-Köhler* benutzt man in Kompensatoren solcher Konstruktion auch sehr dünne Glimmerplättchen ($\lambda/10$ bis $\lambda/30$), um kleinste Gangunterschiede, z.B. in organischen Strukturen, zu messen. Die gemessenen Gangunterschiede werden nach der Gleichung

$$R_1 = -R_2 \sin 2\psi_2$$

berechnet.

Hierin bedeuten R_2 Eichwert des Kompensators und ψ_2 gemessene Differenz des Azimuts zwischen

Nullage des Kompensators und Kompensationslage [183] [198].
Als Beispiel für die praktische Verwendung eines Meßkompensators sei der Umgang mit einem Ehringhaus-Kompensator näher geschildert. Wie im Bild 6.92 ersichtlich, wird die bei der Messung zur Kompensation eines Gangunterschieds erforderliche Kippung der Kompensatorplatte über ein Getriebe bewirkt. Der Bereich der Winkelskale beträgt 180° und ist von 5° zu 5° geteilt. In der Normalstellung steht die Kompensatorplatte senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops, und die Skale zeigt auf 90°. Die Meßtrommelteilung beträgt 5°, die in Zehntelgrad unterteilt sind. Mit dem vorhandenen Nonius kann der Kippwinkel auf 0,01° abgelesen werden. Eingeschoben wird der Kompensator in einer Richtung, die 45° zu den Schwingungsrichtungen der Polare liegt (SO-NW). Beim Gebrauch im Tubusdurchbruch wird er im direkten Strahlengang benutzt. Das Bildfeld ist mit hyperbelartigen Interferenzkurvenscharen (Bild 6.94) durchsetzt, die beim Drehen der Rändelschraube der Meßtrommel diagonal durchs Feld wandern. Ein Interferenzkreuz 0. Ordnung passiert dabei die Mitte des Gesichtsfelds. Bei Verwendung einfarbigen Lichts sind die Interferenzstreifen dunkel, und bei weißem Licht treten die bekannten Interferenzfarben auf. Zur Kompensation eines doppelbrehcenden Objekts wird dieses auf dem Drehtisch des Mikroskops so ausgerichtet, daß durch Drehen des Tisches eine Subtraktionsstellung hergestellt wird, d.h., die Richtung der größeren Brechzahl n_γ des Objekts steht rechtwinklig zu n_γ der Kompensatorplatte. Dann tritt beim Kippen der Platte ein schwarzer Kompensationsstreifen auf, der mit der Meßtrommel in Fadenkreuzmitte gebracht wird. In dieser Stellung heben sich Gangunterschiede im Objekt und in der Platte auf. Der Kippwinkel für den Meßstreifen wird einmal bei einem Skalenwert über 90° und durch Zurückdrehen der Meßtrommel unter 90° ermittelt (wegen der symmetrischen Lage der Interferenzstreifen). Der tatsächliche Kippwinkel berechnet sich daraus als halber Wert der Differenz der beiden Ablesungen. Aus der dem Kompensator beigegebenen Funktionstafel oder einer Eichkurve kann dann der Wert des Gangunterschieds entnommen werden. Bei Interpolation zwischen den einzelnen Wellenlängen in den Funktionstafeln müssen Dispersionsformeln verwendet werden. Voraussetzung für einwandfreie Messungen mit dem Meßkompensator ist die korrekte Einstellung des Dunkelstreifens bei beschränkter Beleuchtungsapertur.

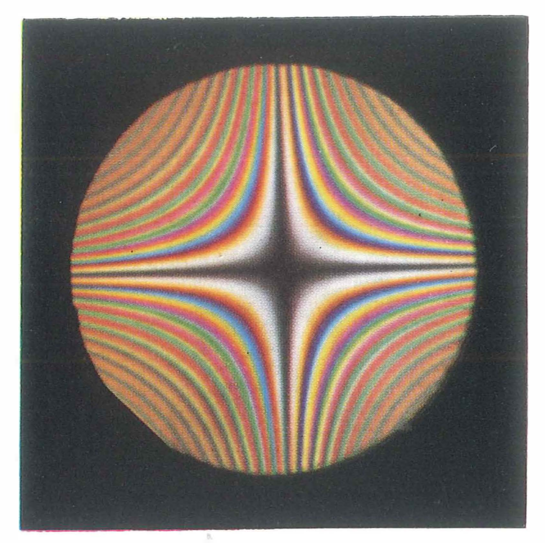


Bild 6.94. Interferenzbild der Kristallmeßplatte eines Meßkompensators nach Ehringhaus im weißen Licht
Gemäß der Orientierung zeigt das Interferenzbild hyperbelartige, farbige Interferenzstreifen verschiedener Ordnungen

Die optische Beschaffenheit des Objekts ist natürlich von Einfluß auf die Ausbildung des Kompensationsstreifens. Wie sich die Kompensation praktisch bei einem Bestandteil eines Dünnschliffs auswirkt, ist in den beiden Farbbildern 6.95a und b dargestellt. Es handelt sich dabei um einen Dünnschliff eines Norits von Bamle, M 32:1, in dem zwischen Plagioklasleisten einige Olivinkristalle eingeschlossen sind. Ein Rechenbeispiel für die Gleichung $R'_{(\lambda)} = d/\lambda\,(n'_\gamma - n'_\alpha)$ sei noch durchgeführt.
Soll z.B. die Dicke einer Quarzplatte, die parallel zur optischen Achse aus einem Kristall herausgeschnitten wurde, nach dieser Methode bestimmt werden, so ergibt sich zunächst die Doppelbrechung des Quarzes zu 0,00911 für $\lambda = 589$ nm. Nach Auflegen auf den Drehtisch und Orientierung in die Subtraktionsstellung werden die beiden folgenden Kippwinkel abgelesen:

$$a = 114{,}62^\circ$$
$$b = 65{,}60^\circ$$
$$a - b = 49{,}02^\circ$$
$$i = \frac{a-b}{2} = 24{,}51^\circ.$$

Das entspricht lt. Funktionstafel einem Gangunterschied von 11806 nm (= 0,011806 mm).

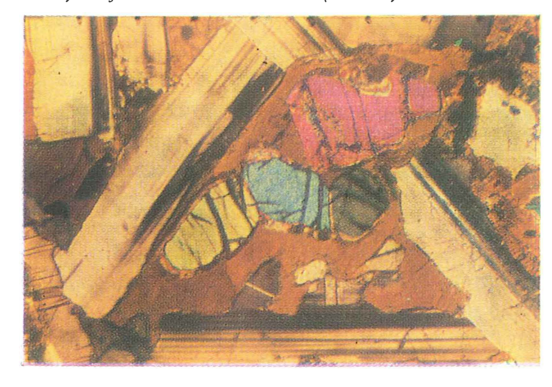
Durch Einsetzen in $R'_{(\lambda)} = d/\lambda\,(n'_\gamma - n'_\alpha)$ wird

$$d = \frac{R'_{(\lambda)}\lambda}{n'_\gamma - n'_\alpha} = \frac{0{,}011806}{0{,}00911} = 1{,}2959$$

$$d \approx 1{,}296\,\text{mm}.$$

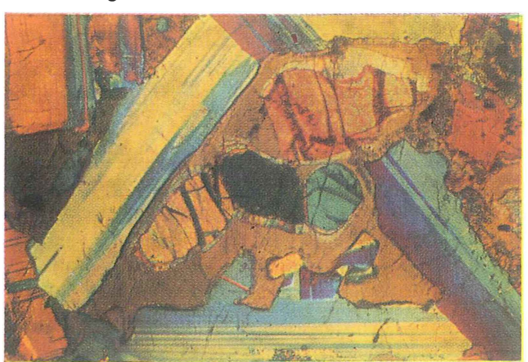
Die Dicke der Platte beträgt 1,296 mm. Ermittelt man ihre Dicke mit dem Mikroskop (s. Abschn. 6.1.4.4.), so kann nach Messung des Gangunterschieds $R'_{(\lambda)}$ aus dieser Gleichung auch die Doppelbrechung ermittelt werden.
Da bei diesem Beispiel eine orientiert zur optischen Achse geschliffene Quarzplatte gewählt wurde, handelt es sich um einen extremen Doppelbrechungswert ($n_\gamma - n_\alpha$). In diesem Zusammenhang soll nochmals auf die im Bild 6.89 dargestellte Tafel der Interferenzfarbfolge eingegangen werden. Auch aus dieser sind Doppelbrechungswerte zu entnehmen, weil sie die Zuordnung der Größen d, $n_\gamma - n_\alpha$ und R enthält. Nimmt man den Fall an, daß ein Kristall bei einer Schliffdicke von 0,03 mm das Rot der 1. Ordnung (R = 551 nm) zeigt, so errichtet man bei dem Abszissenwert 551 nm eine Ordinate bis zur Höhe des Wertes 0,03 und bemerkt dann, daß sich in diesem Farbbereich zwei Radialstrahlen befinden, die, bis zum oberen Rand verfolgt, auf Doppelbrechung von 0,018 bis 0,019 stoßen. Andererseits ist es möglich, umgekehrt bei bekannten Doppelbrechungen, die in einem Schliff bestimmter Dicke auftreten, die Interferenzfarben zu bestimmen.
Schließlich besteht noch die Möglichkeit, bei einer bestimmten Schliffdicke und Farbe den Gangunterschied bzw. die Doppelbrechung abzuschätzen. Die hier besprochenen Zusammenhänge gehen auf *Mallard* zurück und werden von *Michel-Lévy* in einer Farbtafel übersichtlich dargestellt.

Bild 6.95. Kompensation des Gangunterschieds eines Kristalls im Dünnschliff mit dem Meßkompensator nach Ehringhaus im direkten Strahlengang (weißes Licht) Objekt: Norit von Bamle (Olivin) M 32:1



a) P + zentraler Olivinkristall erscheint grün-blau;

b) P + und Ehringhaus-Kompensator in Subtraktionsstellung: Kompensation des Gangunterschieds an der dunklen Kompensationsfarbe zu erkennen. Die Interferenzfarben der übrigen Kristalle ändern sich je nach Orientierung



Imbibitionsmethode

Die Imbibitionsmethode wurde von *Ambronn* [183] zum Nachweis der Formdoppelbrechung entwickelt. Sie beruht darauf, das Präparat mit geeigneten Flüssigkeiten mit schrittweise steigender Brechzahl zu durchtränken, bis die Brechzahlen von fester Substanz und Imbibitionsmittel abgeglichen sind. Die zu diesen Etappen gehörigen Doppelbrechungen werden über den Gangunterschied mit Kompensatoren gemessen und in ein Koordinatensystem eingetragen, dessen Abszissen die Werte der ansteigenden Brechzahlen der Imbibitionsflüssigkeiten enthalten und dessen Ordinaten die gemessenen Gangunterschiede oder die Doppelbrechung darstellen (s. Bild 6.75). Als Meßergebnisse treten positive und negative Werte auf. Bei der Eintragung wirkt die Abszissenachse als Grenzlinie der Isotropie. Voraussetzung für derartige Messungen ist, daß diese an einem Objektstück bzw. nur an solchen Stücken des Präparats durchgeführt werden, deren Ausgangszustand gleich ist (gleicher Gangunterschied!). Außerdem soll die Imbibitionsflüssigkeit das zu untersuchende Material nicht angreifen oder ändern (z. B. Quellen) und sich auch aus dem Präparat wieder restlos entfernen lassen. Die nacheinander benutzten Flüssigkeiten sollen sich auch gut mischen lassen. Mit Wasser mischbare Mittel werden bevorzugt. Das Durchtränken des Präparats ist zeitintensiv. Die Verwendung eines Thermostaten soll die Imbibition beschleunigen. Grundsätzlich kann

das Verfahren auf einem Objektträger durchgeführt werden; dieser wird dann in Küvetten, die mit Imbibitionsmitteln angefüllt sind, behandelt. Die Brechzahlen der verwendeten Flüssigkeiten müssen vorher nach bekannten Methoden (s. Abschn. 6.1.4.4.) bestimmt worden sein.

Auslöschungsschiefen und ihre Bestimmung

Ein Kristall zeigt beim Drehen auf dem Objekttisch zwischen gekreuzten Polaren 4 × Hell- und 4 × Dunkelstellung. In der Dunkelstellung stimmen die Schwingungsrichtungen im Kristall mit denen vom Polarisator bzw. Analysator überein. Die Lagen der Schwingungsrichtung bzw. der Auslöschungsrichtung in einem Kristall sind von der Lage der Indikatrix im Kristall abhängig. Es besteht also auch umgekehrt die Möglichkeit, aus der Lage der Auslöschungsrichtung auf die Orientierung der Indikatrix in einem Kristall Rückschlüsse zu ziehen. Es ist dazu erforderlich, die Auslöschungsrichtungen in Bezug auf bestimmte Richtungen im Kristall, wie Kristallkanten, Spaltrisse, Zwillings- oder Verwachsungsebenen, zu bestimmen. Das ist für die Charakterisierung des Untersuchungsmaterials von großer Bedeutung. Unter Auslöschungswinkel oder Auslöschungsschiefe wird dabei die winkelmäßige Lage einer Schwingungsrichtung gegenüber einem kristallografischen Bezugselement verstanden. Man unterscheidet eine Reihe von Standardfällen, je nachdem, wie die Schwingungsrichtungen zu den gewählten Bezugsrichtungen liegen. Bei der geraden Auslöschung liegen beide Richtungen parallel zueinander, bei der symmetrischen Auslöschung ist die Lage zweier kristallografischer Bezugsrichtungen zur Schwingungsrichtung symmetrisch, und bei schiefer Auslöschung bilden kristallografische und Schwingungsrichtung einen von 0 oder 90° verschiedenen Winkel miteinander. Den Auslöschungswinkel ermittelt man durch Drehen des Objekttisches von der Auslöschungslage des Kristalls (Ablesung σ_1) bis zur Parallelstellung der kristallografischen Bezugsrichtung mit dem vertikalen Arm des Fadenkreuzes (Ablesung σ_2). Dessen Lage entspricht der Schwingungsrichtung des vom Polarisator kommenden Lichts. Mit Hilfe eines Kompensators wird die der Auslöschungslage entsprechende Richtung n'_γ bzw. n'_α bestimmt. Ein Beispiel ist im Bild 6.96 dargestellt, in dem der Winkel σ die schiefe Auslöschung in Bezug auf die Kristallkante und die Spaltbarkeit darstellt. Bei solchen Messungen ist eine Beschränkung der Beleuchtungsapertur zu empfehlen; das bedingt die Verwendung starker

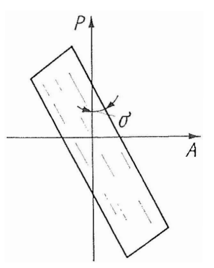


Bild 6.96. Definition eines Auslöschungswinkels σ

P Schwingungsrichtung des Polarisators;
A Schwingungsrichtung des Analysators;
σ Auslöschungsschiefe in Bezug auf die Kante des Kristalls und die angedeutete Spaltbarkeit

Lichtquellen. Auch ist die Dispersion von Einfluß, d.h., für verschiedene Wellenlängen findet man verschiedene Auslöschungswinkel. Die Schwingungsrichtungen der Polare müssen den Fäden des Fadenkreuzes sehr genau parallel liegen. Auf die vorteilhafte Verwendung von Halbschattenvorrichtungen kann hier nur hingewiesen werden. Einzelheiten dazu müssen physikalischer Spezialliteratur entnommen werden.

Messungen bzw. Bestimmungen im indirekten Strahlengang

Bestimmung des optischen Charakters

Auf den Charakter der Interferenzbilder im indirekten (konoskopischen) Strahlengang ist bereits im Abschn. 6.1.4.2. hingewiesen worden. In diesem Abschnitt soll dargestellt werden, wie derartige Interferenzbilder für die Beurteilung von Kristallen auszunutzen sind. Man spricht von der Bestimmung des optischen Charakters und versteht darunter die Feststellung, ob ein Kristall einachsig oder zweiachsig und ob er optisch positiv oder negativ ist. Nachdem das Objekt eingestellt wurde, wird die Bertrand-Linse eingeschaltet und die Beleuchtungsapertur durch Zuschalten der Frontlinse des Kondensors erhöht. Das Interferenzbild (Achsenbild) des Kristalls wird seinerseits mit der Bertrand-Linse fokussiert. Um einen Überblick über die beim Zuschalten der Kompensatoren auftretenden Erscheinungen zu erhalten, werden als Beispiele Kristallquerschnitte bestimmter optischer Orientierung ausgewählt. Die unveränderten Achsenbilder ein- und zweiachsiger Kristalle wurden bereits im Bild 6.80 dargestellt.
Im Bild 6.97 findet man die veränderten Achsenbilder positiver und negativer einachsiger und

zweiachsiger Kristalle nach Zuschalten der Kompensatoren (Rot I und $\lambda/4$). Dazu wurden bei einachsigen Kristallen senkrecht zur optischen Achse orientiert geschliffene und bei zweiachsigen Kristallen senkrecht zur spitzen Bisektrix geschliffene Kristallplatten in Diagonal- und Normalstellung verwendet. Die Einschiebrichtung der Kompensatoren und die optische Orientierung sind vermerkt sowie, ob der Kristall positiv oder negativ ist. In der ersten Zeile sind die Achsenbilder ohne Mitwirkung von Kompensatoren zu finden. In der zweiten Zeile ist die Einwirkung des Kompensators (Rot I) und in der dritten Zeile die Veränderung der Interferenzfiguren beim Einschieben des Kompensators (Grau) vermerkt. Es ist zu beobachten, daß bei positiven Kristallen im I. und III. Quadranten ein Steigen der Interferenzfarben nach Blau eintritt, wenn der Kompensator (Rot I) verwendet wird. Außerdem erscheint die Isogyre in der Farbe Rot I. Bei negativen Kristallen treten diese Erscheinungen in den benachbarten Quadranten auf. Bei Verwendung des Kompensators (Grau) beobachtet man im II. und IV. Quadranten und bei negativen Kristallen in den benachbarten Quadranten Kompensationspunkte. Die Verhältnisse bei zweiachsig positiven Kristallen sind in der Diagonalstellung, die von zweiachsig negativen in der Normalstellung dargestellt. In der Normalstellung sind die beiden Isogyrenäste zu einem Kreuz verschmolzen, das bei Anwendung des Kompensators (Rot I) in der roten Farbe des Kompensators erscheint. In der Diagonalstellung liegt die Achsenebene in der Richtung SW–NO und in der Normalstellung verläuft sie horizontal O–W. Die Farbänderungen im Bereich der Achsenaustritte sind ebenfalls charakteristisch und sinngemäß zu deuten.

Messung des Achsenwinkels

Der Achsenwinkel bei zweiachsigen Kristallen ist ein ausgezeichnetes Charakteristikum von kristallisierter Materie, das mit dem Polarisationsmikroskop gemessen werden kann. Man unterscheidet den wahren Achsenwinkel im Kristall von dem scheinbaren in Luft gemessenen. Die Zusammenhänge sind im Bild 6.98 dargestellt. Die Achsenebene liegt in der Zeichenebene; daher ist der Sinus des halben wahren Achsenwinkels mit der Brechzahl n_β zu multiplizieren, um den scheinbaren Achsenwinkel E zu erhalten $n_\beta \sin V = \sin E$. Der Mittenabstand eines Punkts in der Objektivbrennebene ist proportional zum Sinus des Winkels, den das zugehörige Parallelstrahlbündel im Objektraum mit der Mikroskopachse einschließt.

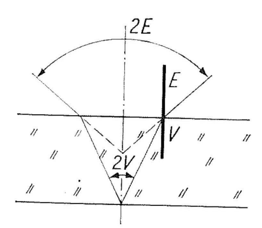


Bild 6.98. Zusammenhang zwischen V und E, dem wahren und scheinbaren E Achsenwinkel

Er ist durch die Brennweite des Objektivs und den entsprechenden Winkel u nach Gl. $d = f \sin u$ gegeben. Bei eingeschalteter Bertrand-Linse betrachtet man das Achseninterferenzbild in der Zwischenbildebene des Mikroskops, wo es, und damit auch d, um einen Faktor vergrößert erscheint. Mit $D = dh$ ergibt sich $\sin u = D/hf$. Die Größe $1/hf = K$ wird als Mallardsche Konstante bezeichnet. Der in der Zwischenbildebene gemessene Mittenabstand ist mit K zu multiplizieren, um den Sinus des im Objektraum zugeordneten Winkels zu erhalten. Mit $u = E$ ergibt sich daraus der scheinbare Achsenwinkel. Es besteht also zunächst die Aufgabe, die Mallardsche Konstante für verschiedene Objektiv-Okular-Kombinationen festzulegen. Dazu benötigt man eine senkrecht zur spitzen Bisektrix geschnittene Platte eines zweiachsigen Kristalls, für die also die beiden Achsenaustritte im Bildfeld zu beobachten sind. Je größer dieser Winkel zwischen den Achsenaustritten ist, um so höher muß die Apertur des zur Messung verwendeten Objektivs sein. Es werden hierzu nicht zu dünne Platten ausgewählt, damit die Hauptisogyren möglichst scharf ausgebildet sind. Man kann in der Diagonalstellung (45°-Stellung) oder auch in der Normalstellung (Kreuzstellung) messen und benutzt zur Messung eine Okularmeßplatte oder ein Meßschraubenokular, die vorher mit einer Objektmeßplatte ausgewertet wurden. Die Zuordnung Länge – Winkel erfolgt unter Zugrundelegung bekannter Achsenwinkel, die vorher mit einem Achsenwinkelapparat festgestellt wurden. Auch eines der bekannten Apertometer nach *Abbe* oder *Metz* eignet sich für solche Winkelbestimmungen. Es bietet den Vorteil, daß kontinuierlich veränderliche Winkel zur Messung zur Verfügung stehen.

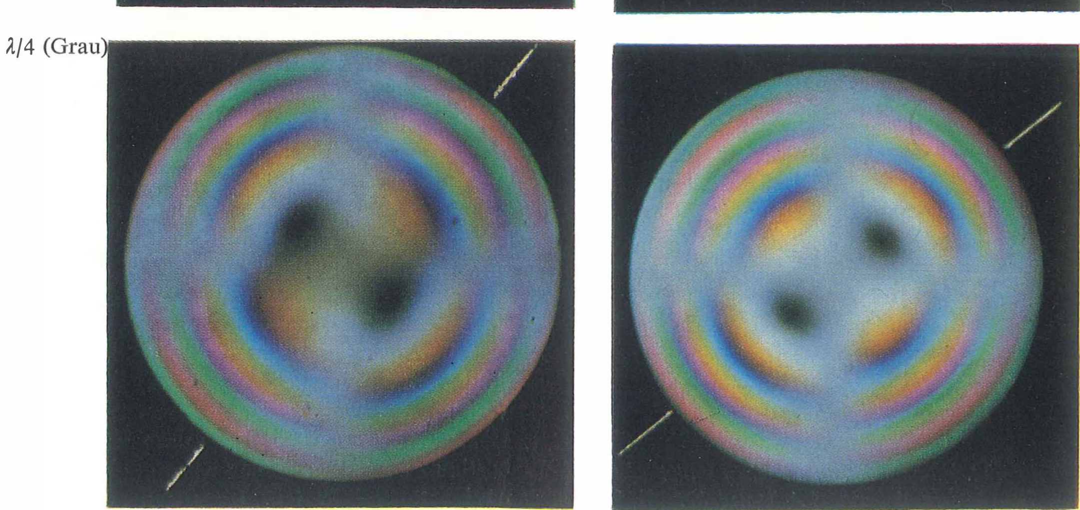
Die mikroskopische Methode der Achsenwinkelbestimmung hat gewisse Grenzen, die die Genauigkeit beeinflussen. Da die sog. Objektiv-

Kristall	einachsig positiv	einachsig negativ

ohne Kompensator

λ (Rot I)

$\lambda/4$ (Grau)



Normalstellung zweiachsig negativ Diagonalstellung zweiachsig negativ

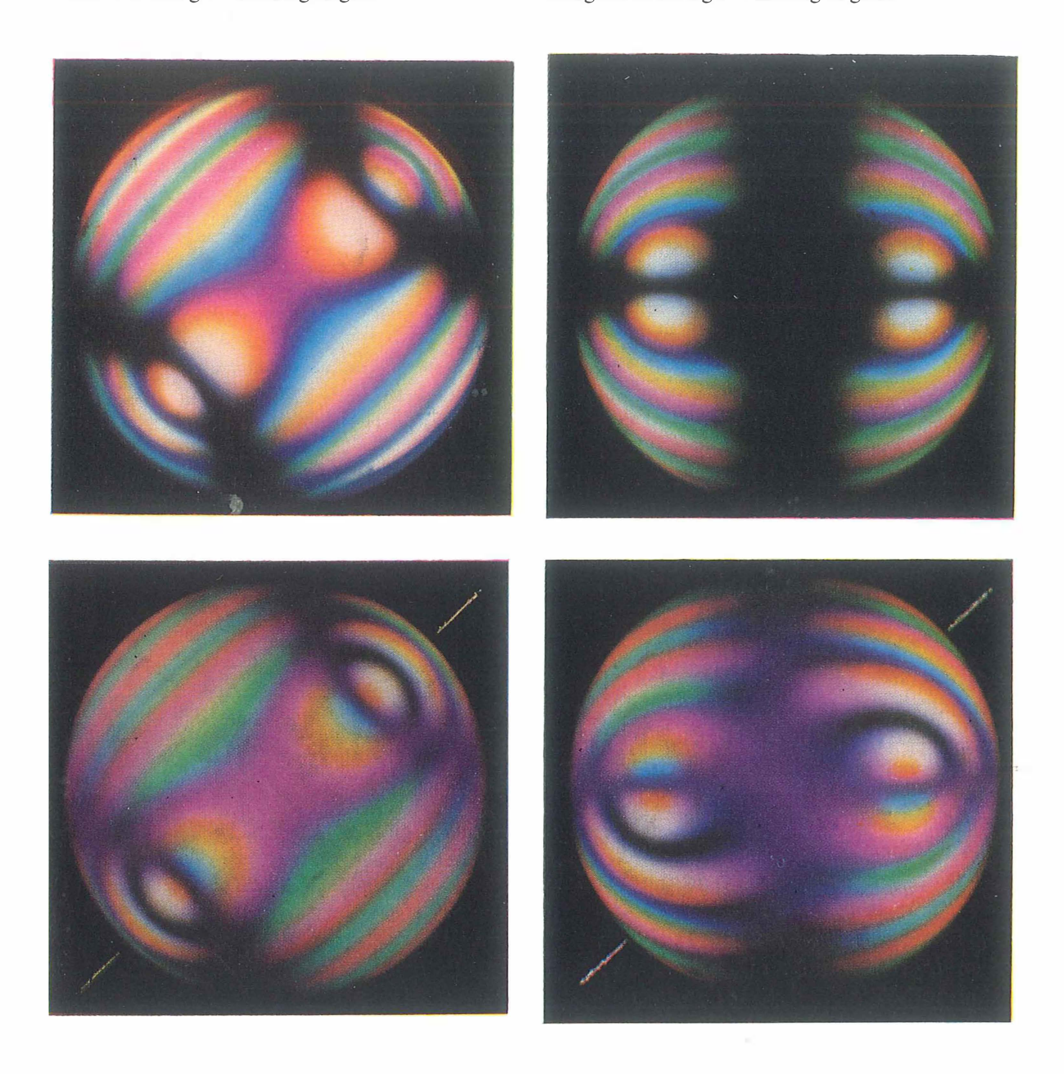


Bild 6.97. Achsenbilder ein- und zweiachsiger Kristalle ohne und unter Mitwirkung von Kompensatoren λ (Rot 1) und λ/4 (Grau 1)

Einschieberichtung des Kompensators: (SO–NW, optische Orientierung der Schwingungsrichtung des verwendeten Kompensators n_γ (SW – NO).

Die typischen Kompensationsstreifen und -punkte, die Additionsfarben an den Isogyren und Isochromaten sowie das charakteristische Wandern der Isochromaten sind skizzenhaft dargestellt.

brennebene in Wirklichkeit eine besonders nach dem Rande zu stärker gekrümmte Fläche ist, die in ihr liegenden Bildpunkte beim Messen jedoch auf eine Ebene projiziert sind, werden die Abweichungen vom wahren Winkelwert nach dem Rande des Bildfelds zu groß, d.h., die Mallardsche Konstante ist keine solche. Bei modernen Objektivkonstruktionen ist dieser Fehler jedoch gering, so daß die Bestimmung des Achsenwinkels mit einer für die Praxis genügenden Genauigkeit auszuführen ist.

Grundsätzlich ist der beschriebenen Methode eine Grenze gesetzt, da keine größeren Winkel gemessen werden können, als es die Apertur des benutzten Objektivs zuläßt. Auch muß die Apertur des Kondensors so auskorrigiert sein, daß die volle Öffnung des Objektivs ausgeleuchtet ist. Man verwendet daher für solche Messungen aplanatisch-achromatisch korrigierte Kondensoren. Achsenwinkelmessungen an Schnitten, die nicht senkrecht zur spitzen Bisektrix, aber senkrecht zur Ebene der optischen Achsen getroffen sind, können mit der beschriebenen, jedoch geringfügig modifizierten Methode noch durchgeführt werden. Achsenwinkelbestimmungen an Schnitten normal zu den Bisektrizen bei beliebig großem Achsenwinkel oder normal n_β sind über Gangunterschiedsmessungen im Interferenzbild möglich [185].

U-Tisch-Methoden

Die nutzbare Verwendung von Universaldrehtischen zusammen mit einem Polarisationsmikroskop geht auf *E. V. Fedorow* [185] zurück. Obwohl diese Methode nicht alle wünschenswerten kristall-optischen Methoden durchzuführen gestattet, also keine „Universalmethode" darstellt, hat sie doch viele kristalloptische Untersuchungsarten wesentlich ergänzt und fruchtbar erweitert. Sie ist aus der praktischen Polarisationsmikroskopie nicht mehr fortzudenken, vor allem, nachdem *Schumann* [200] die ergänzende Methode der Drehkonoskopie bekanntgab. Im Prinzip beruht die U-Tischmethode darauf, daß mit einer im Raum drehbaren Vorrichtung in Form eines Drehtisches, der früher mit dem Mikroskop fest verbunden war und heute als Zusatzeinrichtung zum Polarisationsmikroskop gebaut wird, die Möglichkeit geschaffen ist, ein Mineralkorn nach verschiedenen Richtungen zu durchmustern. Hierdurch wird es möglich, bei direkter und indirekter Beobachtung die Orientierung der Indikatrix und mit Doppelbrechungsmessungen und Immersionsmethoden auch ihre Form und ihre Dimensionen zu ermitteln. Sie gestattet ebenfalls Aussagen über die Lage der Indikatrix zu markanten kristallografischen Richtungen, wie Spaltrissen, Kristallkanten und Zwillingsgrenzen, festzuhalten. Es ist nicht möglich, hier einen umfassenden Überblick über die verschiedenen Arten des nutzbaren Einsatzes zu geben, man kann nur das Grundsätzliche der Methode darstellen.

Instrumenteller Aufbau des U-Tisches

Je nach mechanischer Ausführung unterscheidet man zwei- und mehrachsige Drehtische. Wir werden für die grundsätzlichen Ausführungen den vierachsigen U-Tisch auswählen und einige ergänzende Bemerkungen zum fünfachsigen hinzufügen.

Dreh- und Kippbewegungen werden durch eine kardanische Anordnung ermöglicht. Dabei

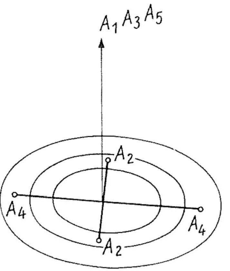


Bild 6.99. Bezeichnungsschema der Dreh- und Kippachsen nach Berek am U-Tisch
A_1, A_3, A_5 vertikale Drehachsen; A_2, A_4 horizontale Kippachsen; A_1 bis A_4 Achsen am U-Tisch; A_5 Drehachse des Mikroskoptisches
Index von innen nach außen am U-Tisch steigend

liegen die Achsen in der Ausgangsstellung senkrecht zur oder in der Tischebene, wie im Bild 6.99 gezeigt wird. Die Bezeichnung der Achsen wurde nach *Berek* gewählt. Das hat hinsichtlich der Systematik den Vorteil, daß die Betätigung einer Achse mit höherem Index die Lage aller vorhergehenden Achsen mit kleinerem Index ändert, die mit höherem Index jedoch nicht. Die Achsen mit ungeradem Index stehen senkrecht und die mit geradem Index horizontal. Außer der *Berek*schen Bezeichnungsweise gibt es solche anderer Autoren, auf die hier nur hingewiesen werden kann [185].

Im Bild 6.100 ist der vierachsige Drehtisch aus der Jenaer Fertigung auf dem Mikroskoptisch des AMPLIVAL pol d dargestellt.

Mit einer Grundplatte *1* wird der U-Tisch auf dem Mikroskoptisch mit Befestigungsschrauben *4*

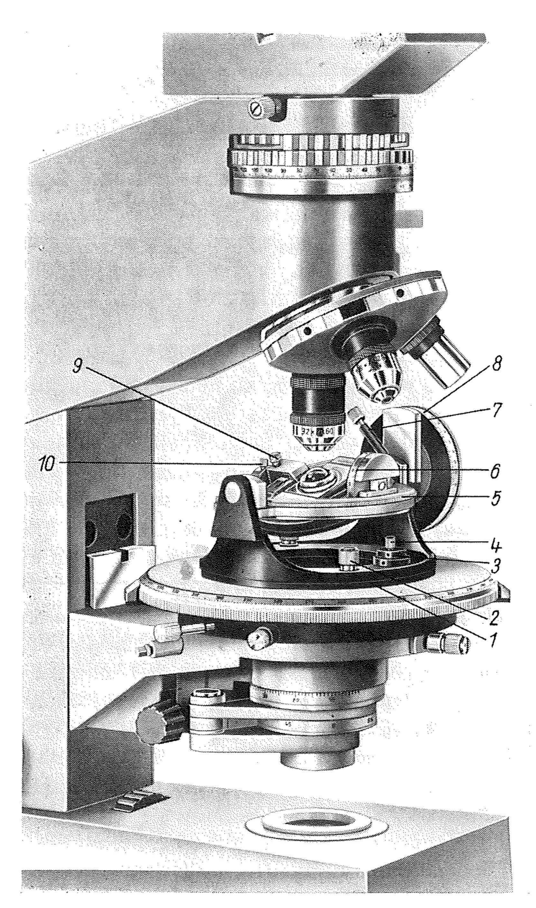


Bild 6.100. Vierachsiger U-Tisch auf dem Drehtisch des AMPLIVAL pol d

1 Grundplatte des U-Tisches; *2* Arretierungsschraube für die Zentrierung; *3* Zentriervorrichtung für den U-Tisch; *4* Befestigungsschraube für den U-Tisch auf dem Mikroskoptisch; *5* Gradteilung für A_3-Achse; *6* Gradteilung für A_2-Achse; *7* Arretierung für A_4-Achse; *8* Gradteilung für A_4-Achse; *9* oberes Segment mit Halterung; *10* Arretierungsschraube für A_2-Achse

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

befestigt. Das Gestell, das die Achsen trägt, ist auf einer Grundplatte zentrierbar angeordnet. Die Achse A_1 (Bilder 6.99 und 6.100) ist die innere Vertikalachse; der ihr zugeordnete Teilkreis ist auf 1° ablesbar. Die Kippung um die Horizontalachse A_2 wird auf einem dem Beobachter zugewandten Zylinderstück *6* mit einer Gradteilung und einem Nonius abgelesen (Ablesegenauigkeit 0,5°). Die Drehung um die zweite Vertikalachse A_3 wird an dem äußeren Tischring *5* ebenfalls an einer Gradteilung zusammen mit einem Nonius auf 0,1° abgelesen. Die Horizontalachse A_4 wird häufig auch als Kontrollachse bezeichnet. Die Kippwinkel α_4 nach vorn und nach hinten sind an einer Meßtrommel ebenfalls mit einem Nonius auf 0,1° abzulesen. Diese sitzt nach Aufsetzen des U-Tisches auf den Mikroskoptisch zur rechten Hand des Beobachters. Die Drehachse A_5 stellt die Drehachse des Mikroskoptisches dar. Sie verläuft der optischen Achse des Polarisationsmikroskops parallel und ist erforderlich, um den U-Tisch in die Diagonalstellung zu bringen. Moderne Tische eines Polarisationsmikroskops haben deshalb eine 45°-Rastung. In der Ausgangsstellung des U-Tisches verlaufen die Vertikalachsen A_1, A_3 und A_5 untereinander parallel, die Horizontalachsen A_2 und A_4 rechtwinklig zu diesen und untereinander. Außer A_1 sind alle Achsen mit entsprechenden Klemmschrauben *4*, *7* und *10* in jeder Stellung arretierbar. Das untere Teil der erforderlichen durchsichtigen Segmente (es werden zu dem U-Tisch Segmentpaare mit drei verschiedenen n_D-Werten geliefert: $n_D = 1{,}516$; $n_D = 1{,}556$; $n_D = 1{,}648$) wird im Mittelteil des U-Tisches in ein Ringlager eingehängt, das Präparat auf ihm mit Immersionsflüssigkeit entsprechender Brechzahl blasenfrei in optische Verbindung gebracht. Das obere Segment *9* wird ebenfalls mit Immersionsflüssigkeit versehen und dann über dem Präparat mit einer Befestigungsschraube im Mittelteil befestigt. Aus Gründen der Beweglichkeit des U-Tisches werden die oberen Segmente oft kleiner gehalten; das beeinflußt die Meßgenauigkeit, die aber auch dann noch für die Meßpraxis ausreichend ist. Die zum U-Tisch empfohlenen Objektive sind für die Verwendung mit den Segmenten besonders korrigiert und als solche mit S gekennzeichnet. Die stärkeren Objektive haben zur Beschränkung der Beobachtungsapertur Irisblenden. Wegen der höheren Objektlage müssen die Schnittweite des Kondensors und seine Apertur besonders berechnet sein, um für den direkten und den indirekten Strahlengang volle Ausleuchtung zu garantieren. Die Höhenverstellung des Präparats, das im Schnittpunkt der Achsen liegen muß, erfolgt mit einer besonderen Vorrichtung.

Nachdem der U-Tisch auf dem Drehtisch des Polarisationsmikroskops montiert ist, muß er justiert werden. Dazu gehört vor allem zunächst die Justierung der Objektive und des U-Tisches zur Achse des Drehtisches.

Im einzelnen hält man sich hierbei an die Justiervorschriften, die von den Herstellern solcher U-Tische aufgestellt und empfohlen werden.

Bei indirekten Beobachtungen müssen Objektive höherer Apertur, z.B. 30/0,60 S, verwendet wer-

den; dazu ist eine entsprechende Beleuchtungsapertur einzustellen.
Weichen die Brechzahlen des zu untersuchenden Materials von denen der zur Verfügung stehenden Glassegmente ab ($> 0{,}1$), so müssen die Winkelablesungen am U-Tisch korrigiert werden. Hierzu sind besondere Verfahren entwickelt worden. Meist benutzt man zur Korrektion der Winkel Nomogramme. Sie liegen vor nach Angaben von *E. V. Fedorow* und von *E. Tröger* [196] [197].
Das Prinzip der Anwendung des U-Tisches beruht darauf, an Kristallen die optischen Symmetrieebenen aufzusuchen und den Charakter der darauf senkrecht stehenden Hauptschwingungsrichtung zu bestimmen. Dabei wird so vorgegangen, daß zunächst das Präparat durch Drehen um A_1 in die Auslöschungsstellung gebracht wird. Eine folgende Kippung um A_4 nach vorn oder hinten stellt fest, ob Aufhellung erfolgt oder nicht. Erfolgt Aufhellung, so liegt eine optische Symmetrieebene nicht normal zu A_4. Die Dunkelstellung wird durch ein Kippen um A_2 nach links oder rechts wieder hergestellt. Erneutes Kippen um A_4 gibt Auskunft, ob die erlangte Dunkelstellung erhalten bleibt; wenn nicht, muß durch erneutes Drehen um A_1, wobei A_4 auf Null eingestellt ist, weiterkorrigiert werden. Dieser Prozeß wird fortgesetzt, bis die Dunkelheit bei Drehung der Kippachse A_4 erhalten bleibt. Jetzt steht fest, daß eine optische Symmetrieebene normal zur Achse A_4 steht, d.h., in der Richtung A_4 liegt eine Hauptschwingungsrichtung (= Symmetrieachse). Azimut α_1 und Kippwinkel α_2 dieser Symmetrieebene werden an den entsprechenden Teilkreisen abgelesen, wobei zu unterscheiden ist, ob A_2 nach links oder nach rechts gekippt wurde. Daran anschließend wird der Charakter der eingestellten Symmetrieebene (Normale zur Symmetrieebene) mit Hilfe von Kompensatoren nach früher beschriebenen Methoden in der 45°-Stellung bestimmt (s. Abschn. 6.1.4.2.). Ist die eingestellte Symmetrieebene die optische Achsenebene, so liegt bei zweiachsigen Kristallen n_β in der Richtung A_4. Tritt beim Kippen um A_4 zweimalige Verdunklung ein, so kann der Achsenwinkel $2V$ gemessen werden. Tritt beim Kippen um A_4 keine Verdunklung ein, so liegt in der Richtung A_4 n_γ oder n_α. Auf die gleiche Weise wird die Bestimmung der zweiten Symmetrieebene vorgenommen. Durch Eintragen der Meßergebnisse in ein stereografisches Netz kann die Lage der dritten Symmetrieebene konstruktiv ermittelt werden. Die Beschreibung der Durchführung solcher Projektionen würde hier zu weit führen. Ihre Handhabung ist aus Spezialliteratur [197] [205] zu entnehmen.
Auch einachsige Kristalle können mit dem U-Tisch vermessen werden. Man muß dabei beachten, daß die optische Achse immer eine Symmetrieachse der Indikatrix darstellt und daß jede durch diese verlaufende Ebene eine Symmetrieebene ist. Das heißt, für eine eingestellte Richtung bleibt eine Richtung beim Kippen um A_4 immer erhalten, woraus folgt, daß $\alpha_2 = 0$ ist. Diese Methode wurde besonders zur Bestimmung der Zwillingsgesetze an Feldspaten und zur Ermittlung des Chemismus der Plagioklase entwickelt. Dabei werden auch Spaltflächen und Zwillingsverwachsungsebenen eingemessen. Die Meßergebnisse werden auch hier in stereografische Projektionen übertragen und können mit Nomogrammen, die auf *Fedorow*, *Nikitin* u.a. zurückgehen, ausgewertet werden. Spezielle U-Tischmethoden gestatten die Messung von Gangunterschieden in einer bestimmten Richtung, die Ermittlung von $2V$ aus Gangunterschiedsmessungen, Bestimmung der drei Hauptdoppelbrechungen und der Schliffdicke aus der bekannten Doppelbrechung des Quarzes, Bestimmung des Pleochroismus und der Absorption zweiachsiger Kristalle u.a. Die Untersuchung der Pyroxene und Amphibole u.a. Mineralgruppen nach ähnlichen Methoden steckt erst in den Anfängen.
Noch einige Worte über den fünfachsigen U-Tisch. Er wurde im Jahre 1929 durch *Emmons* [187] eingeführt. Die fünfte Achse liegt horizontal und senkrecht zur A_2 und wird gemäß der Berek-Nomenklatur zweckmäßig als A'_2 bezeichnet. Sie liegt also ebenfalls der Richtung der A_4-Achse parallel. Nach Einstellung der optischen Indikatrix auf einem fünfachsigen Drehtisch wird die A'_2-Achse durch Drehen um A_3 in eine Ebene gebracht, die senkrecht zu A_4 und A_2 liegt. Wenn dann A_4 bis zur größten Helligkeit gekippt wird, kann durch Kippung um A'_2 die Dunkelstellung wiederhergestellt werden. Dann liegt bereits die zweite Symmetrieebene parallel zum Vertikalfaden im Fadenkreuzokular. Ihre Vermessung kann also sofort in der bekannten Art erfolgen. Nach diesem Verfahren ist die Anfertigung einer stereografischen Projektion nicht mehr erforderlich, weil bei zweiachsigen Kristallen alle Parameter so ermittelt werden können, wenn es die Schnittlage des Präparats überhaupt erlaubt.
Es wäre noch zu erwähnen, daß durch *Leitz* und *Winkel-Zeiss* Zusatzeinrichtungen zum U-Tisch

gebaut wurden, die eine Erwärmung des Präparats (meistens körnig) ermöglichten, um, nach einem der beschriebenen Immersionsverfahren für die Brechzahlbestimmung, die Brechzahlen für orientierte Lagen des Präparats zu bestimmen.

6.1.5. Fluoreszenzmikroskopie

von Dr. rer. nat. *Ludwig Otto*
Neubearbeitung von
Dipl.-Phys. *Gerhard Börner*

6.1.5.1. Allgemeine Betrachtungen

Der zur Fluoreszenz führende physikalische Vorgang ist eine intramolekulare Energieumsetzung, die durch Einwirkung energiereicher Strahlen auf bestimmte Substanzen induziert wird. Der Gesamtkomplex wird als Lumineszenz bezeichnet und nach zeitlichen und energetischen Gesichtspunkten gegliedert. Von Lumineszenz spricht man, wenn geeignete Substanzen – Festkörper, Flüssigkeiten oder Gase – bei Anregung mit energiereicher Strahlung eine Eigenstrahlung aussenden, deren Wellenlänge größer ist als die der Anregungsstrahlung. Von den Arten der Lumineszenz mit unterschiedlichem Modus der Energieumsetzung, z.B. Thermo-, Chemo-, Elektro-, Fotolumineszenz usw., interessiert für die Fluoreszenzmikroskopie die Fotolumineszenz, d.h. die Anregung durch Lichtstrahlen. Die Zeitspanne zwischen Anregung und Emission ist davon abhängig, wie schnell die Leuchtelektronen des Molekülverbands die Energieniveaus wechseln. Geschieht dies innerhalb einer Zeitspanne von 10^{-9} bis 10^{-7} s, spricht man von Fluoreszenz. Länger andauerndes Nachleuchten gilt als Phosphoreszenz.
Da in der Mikroskopie fast ausschließlich Fluoreszenzerscheinungen beobachtet werden und auch beim gemeinsamen Auftreten von Fluo- und Phosphoreszenz in einem Objekt die Fluoreszenz das wesentliche Diagnosemittel ist, hat man die Bezeichnung Lumineszenzmikroskopie verlassen und ist zur Bezeichnung Fluoreszenzmikroskopie übergegangen.
Einige Präparate haben von sich aus die Eigenschaft zu fluoreszieren; sie zeigen Primärfluoreszenz. Die meisten Präparate müssen jedoch erst mit bestimmten Farbstoffen – Fluorochromen – behandelt werden und zeigen danach bei entsprechender Bestrahlung sog. Sekundärfluoreszenz.

Nach der Stokesschen Regel ist die zu beobachtende emittierte Fluoreszenzstrahlung stets längerwellig als die Erregerstrahlung. Dadurch ist es möglich, Anregungs- und Emissionsstrahlung durch Farbfilter zu trennen.

6.1.5.2. Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Die Leistungsfähigkeit eines Fluoreszenzmikroskops wird durch die Eigenschaften seiner wesentlichen Baugruppen, der Anregungslichtquelle, der Filter und der Optikausrüstung bestimmt (Bilder 6.101 bis 6.103). Die optimale Lichtquelle der Fluoreszenzmikroskopie muß im Spektrum, das die Absorptionsgebiete aller verwendeten Fluorochrome umfaßt, eine ausreichend hohe Leuchtdichte haben. Im Emissionsgebiet der Fluorochrome darf dagegen praktisch keine Energie mehr ausgestrahlt werden. Es ist denkbar, daß diese Forderungen von einem durchstimmbaren

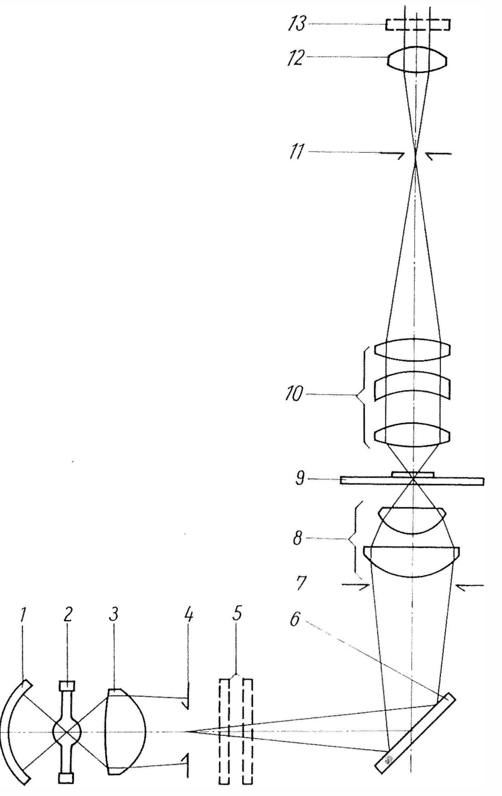


Bild 6.101. Schema eines Fluoreszenzmikroskops mit Anregung im Durchlicht-Hellfeld-Strahlengang

1 Hilfsspiegel; *2* Lichtquelle; *3* Kollektor; *4* Leuchtfeldblende; *5* Erregerfilter; *6* Umlenkspiegel; *7* Aperturblende; *8* Kondensor; *9* Objekt; *10* Objektiv; *11* Zwischenbildebene; *12* Okular; *13* Sperrfilter

Farbstofflaser erfüllt werden können [210] [234]. Die z. Z. verwendeten Lichtquellen stellen einen von den technischen Möglichkeiten diktierten Kompromiß dar. Für Fluoreszenzforschungsmikroskope und für quantitative Untersuchungen (Fluorometrie) werden aus Intensitätsgründen nur Gasentladungslampen, meist Quecksilber-Höchstdrucklampen, verwendet. Ausschlaggebend

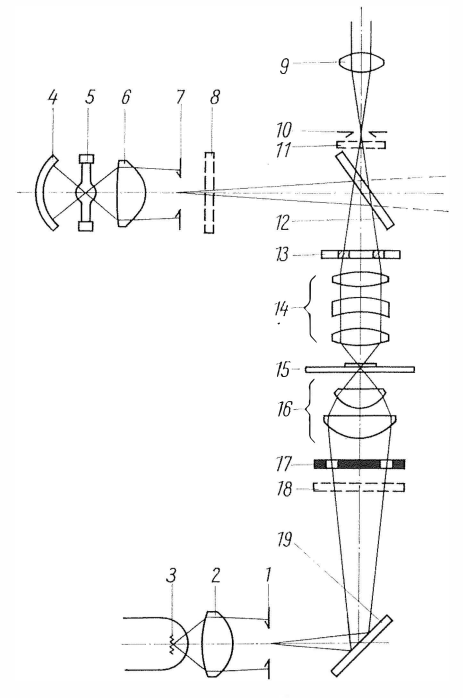


Bild 6.102. Schema eines Fluoreszenzmikroskops mit Anregung im Auflicht-Hellfeldstrahlengang und gleichzeitigem Durchlicht-Phasenkontrast

1 Leuchtfeldblende; *2* Kollektor; *3* Lichtwurflampe; *4* Hilfsspiegel; *5* Anregungslichtquelle; *6* Kollektor; 7 Leuchtfeldblende; *8* Erregerfilter; *9* Okular; *10* Zwischenbildebene; *11* Sperrfilter; *12* Teilerspiegel; *13* Phasenring; *14* Objektiv; *15* Objekt; *16* Kondensor; *17* Ringblende; 18 Grünfilter; *19* Umlenkelement

für diese Wahl ist die Tatsache, daß die dem kontinuierlichen Untergrundspektrum überlagerten charakteristischen Quecksilberlinien bei $\lambda =$ 313, 334, 365, 405, 435 und 546 nm in Anregungs- bzw. Absorptionsgebieten vieler Fluorochrome liegen [242]. Die Intensität des tageslichtähnlichen kontinuierlichen Spektrums von Xenon-Höchstdrucklampen (z. B. XBO 75, XBO 101, XBO 150) erreicht bei weitem nicht die Intensitätsmaxima der Quecksilberlinien. Nur bei Verwendung von Fluorochromen, deren Anregungsbereich nicht mit einer Quecksilberlinie zusammenfällt, oder in der Fluorometrie, wo ihre guten Brenneigenschaften nützlich sind, werden z. T. Xenon-Höchstdrucklampen eingesetzt.

Hochleistungsfluoreszenzmikroskope sind mit einer Quecksilber-Höchstdrucklampe vom Typ HBO 200 o. ä. ausgerüstet. Bei Beurteilung der Leistung der HBO-Typen darf man nicht allein von der Lampenleistungsaufnahme ausgehen. Die Intensität der mit der HBO 200 erzeugten Fluoreszenzbilder ergibt gegenüber der HBO 50 i. allg. nur den Faktor 2 und nicht 4, wie man aufgrund des Verhältnisses der Leistungsaufnahme vermuten könnte. Entscheidend ist die Intensität im eigentlich interessierenden kurzwelligen Bereich und inwieweit bei Köhlerscher Beleuchtung das Lichtquellenbild die Eintrittspupille der Beleuchtungsoptik ausleuchtet. Lampen noch höherer Leistungsaufnahme bringen keine Steigerung der Helligkeit der Fluoreszenzbilder. Die Erklärung ist darin zu suchen, daß eine gewisse Menge anregungsfähiger Substanz, wie sie im mikroskopischen Präparat vorliegt, nur ein bestimmtes Maß an zugeführter Energie in Fluoreszenzlicht umsetzen kann. Wenn dieses Maß für das gesamte Sehfeld erreicht ist, geht weiter zugeführte Energie gleicher Wellenlänge

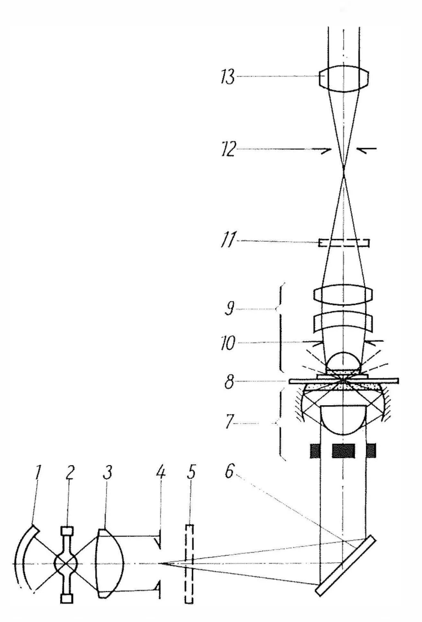


Bild 6.103. Schema eines Fluoreszenzmikroskops mit Anregung im Durchlicht-Dunkelfeldstrahlengang

1 Hilfsspiegel; *2* Lichtquelle; *3* Kollektor; *4* Leuchtfeldblende; *5* Erregerfilter; *6* Umlenkspiegel; *7* Kardioidkondensor; *8* Objekt; *9* Objektiv; *10* Aperturblende; *11* Sperrfilter; *12* Zwischenbildebene; *13* Okular

unverändert durch das Präparat hindurch, ohne die Helligkeit des Fluoreszenzbilds zu steigern.
Vor allem aus Preisgründen werden seit einiger Zeit bei Routineuntersuchungen Halogenlampen mit einer Leistung von 100 W eingesetzt. Sie haben im Ultraviolett und Violett keine bzw. nur sehr geringe Strahlungsanteile, weshalb auch nur die Anregung bestimmter Fluorochrome möglich ist. Die Intensität der Gesamtstrahlung verhält sich zu der von Quecksilber-Höchstdrucklampen etwa wie 1:10 [222]. Relativ zur Anregungsstrahlung ist die Stärke der Fluoreszenzstrahlung sehr gering. Die Ausbeute beträgt zwischen 1,0 und 0,1%. Da das menschliche Auge aber in der Lage ist, Fluoreszenzintensitäten wahrzunehmen, die durch die Umsetzung von nur 0,0002% der eingestrahlten Anregungsenergie hervorgerufen werden, ist eine Beobachtung trotzdem möglich.
Die Filteranlage ist eine weitere grundlegend wichtige Baugruppe jedes Fluoreszenzmikroskops. Man versteht darunter seine Ausrüstung mit Anregungs-, Dämpfungs-, Konversions- und Sperrfiltern und die mechanische Unterbringung dieser Filter im Strahlengang. Sinngemäß sind auch die Teilerspiegel bei Auflichtkondensoren zur Filteranlage zu rechnen.
Die Bezeichnungen aller im folgenden genannten Glasfilter beziehen sich auf Filtergläser, mit denen die Geräte des VEB Carl Zeiss JENA ausgerüstet werden. Mit gleichem praktischem Ergebnis können natürlich auch Filter anderer Hersteller verwendet werden, wenn sie gleichen oder ähnlichen Durchlässigkeitsverlauf zeigen.
Die Anregungsfilter, die jene Wellenlängen aus dem Emissionsspektrum der Lampe aussondern, die für das gewünschte Anregungsverfahren erforderlich sind, finden zwischen Kollektor und Kondensor Platz. Abgesehen von ganz speziellen Routinefluoreszenzmikroskopen muß die Wechselbarkeit aller Filter gewährleistet sein. Weitere Forderungen sind ihre unmißverständliche Kennzeichnung und eine Anordnung im Gerät, die zu keinen Schäden durch die Wärmestrahlung der Lampe Anlaß gibt.
Die Hersteller erfüllen diese Bedingung durch Wärmehärtung der Filter, durch Anordnung der Filter in angemessener Entfernung von der Lampe oder durch Einführung von Wärmeschutzgläsern, die die Ausbeute an Anregungsstrahlung nicht wesentlich schmälern.
Zu den konventionellen Glasfiltern, deren selektierende Wirkung auf dem Absorptionsvermögen verschiedener Metallionen beruht, sind in den letzten Jahren die als Kurzpaßfilter wirkenden Interferenzfilter hinzugekommen. Hier erfolgt die Selektion der Anregungswellenlängen, indem die unerwünschten Anteile des Lampenspektrums durch Interferenz ausgelöscht werden. Mit Hilfe der Kurzpaßfilter können hohe Forderungen in bezug auf Durchlässigkeit, Kantensteilheit und gute Sperrung im Fußpunkt verwirklicht werden.
Die zweite für fluoreszenzmikroskopische Zwecke unentbehrliche Filtergruppe sind die Sperrfilter, in der Literatur auch als Okularsperrfilter bezeichnet. Sie haben die Aufgabe, die im Objekt nicht in Fluoreszenzstrahlung umgesetzte Anregungsstrahlung abzufiltern, damit diese das Fluoreszenzlicht nicht überstrahlt und im Auge des Beobachters auch keine Schutzfluoreszenz hervorruft. Die Sperrfilter müssen deshalb zwischen Objekt und Empfänger der Fluoreszenzstrahlung angeordnet werden.
Die technische Lösung in den ersten Jahrzehnten der Fluoreszenzmikroskopie, die Sperrfilter durch Aufsteckfassungen über den Okularen zu befestigen, ist verlassen worden. Es haben sich bestimmte Standardfilterkombinationen herausgebildet, so daß sich die feste Lagerung der Sperrfilter in einer Wechselvorrichtung anbietet. Zwar verlangt die mit dieser Konstruktion verbundene Anbringung der Filter zwischen Objektiv und Okular eine höhere Güte des Farbglases, seiner Oberflächenbearbeitung und der Flächenparallelität, doch macht die Realisierung dieser Forderungen der modernen Optiktechnologie keine so großen Schwierigkeiten mehr, daß der Konstrukteur auf die Bedienungsvorteile verzichten müßte, die der Einbau einer Sperrfilterwechselvorrichtung dem Benutzer bietet. Der Einbau von Sperrfiltern in das Objektiv, der gelegentlich versucht wurde, hat sich aus optischen und methodischen Gründen nicht bewährt.
Außer den aus sog. Anlaufgläsern bestehenden Sperrfiltern werden auch Interferenzfilter und sogar Beobachtungsmonochromatoren verwendet, da erst dieser Mehraufwand bei manchen fluoreszenzmikroskopischen Problemen zu befriedigenden Ergebnissen führt.
Für die Fluoreszenzanregung im auffallenden Licht ist ein Planglasilluminator nötig, der Interferenzfilterschichten trägt. Diese bewirken eine vorwiegende Reflexion der kurzwelligen Erregerstrahlung, die längerwellige Fluoreszenzstrahlung wird dagegen bevorzugt hindurchgelassen. Solche di- oder polychromatische Spektralteiler (Teilerspiegel) unterstützen bei genauer Abstimmung auf die zugeordneten Erreger- und Sperrfilter diese in ihrer Wirkung [240]. Ebenso wie die Filter müs-

sen die Teilerspiegel zur Anpassung an die jeweils gewählte Fluorochromierung wechselbar sein.
An die Mikroskopoptik stellt die Fluoreszenzmikroskopie bestimmte Anforderungen, deren Beachtung die Ergebnisse merklich verbessern kann. Die Beleuchtungsoptik soll eine möglichst hohe Durchlässigkeit im Bereich der Anregungsstrahlung und der Kondensor eine möglichst hohe Apertur aufweisen. Beide Forderungen zielen auf hohe Anregungsintensität. Mit der Apertur des Kondensors steigt die Beleuchtungsstärke, d.h. die auf das Objekt konzentrierte Anregungsenergie. Die Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet sich bezüglich des Zusammenwirkens von Beleuchtungs- und Beobachtungsstrahlengang grundsätzlich von anderen Mikroskopierverfahren. Der Beleuchtungsstrahlengang trägt nur mittelbar zur Abbildung des Objekts bei, weil er zur Aussendung von Objektstrahlung anregt.
Hierdurch wird das fluoreszenzfähige Objekt zum Selbstleuchter; es gelten also die Gesetzmäßigkeiten für die Abbildung selbstleuchtender Objekte (s. Abschn. 3.).
Große Aperturen sind in der Fluoreszenzmikroskopie besonders wegen ihrer hohen Lichtstärke für die abbildende Optik von Bedeutung. Bei gleicher Maßstabszahl erweisen sich Objektive mit höherer Apertur als besser geeignet, weshalb Apochromate als die besten Objektive für die Fluoreszenzmikroskopie anzusehen sind. Die gute Farbkorrektion und besondere Bildqualität dieser Objektive verbessern die Abbildungsverhältnisse weiterhin.
Als wenig geeignet für reine Fluoreszenzmikroskopie erweisen sich die Phasenkontrastobjektive infolge der Beeinflussung der Abbildung durch den eingebauten Phasenring. Beim Kombinationsbeleuchtungsverfahren Phasenkontrast-Fluoreszenz wird dieser Nachteil zugunsten anderer schwerer wiegender Vorteile in Kauf genommen. Über die Methodik der Fluoreszenzmikroskopie wird später noch zu sprechen sein.

6.1.5.3. Technik der Fluoreszenzmikroskopie

Die verschiedenen Anregungsformen der Fluoreszenzmikroskopie kann man nach der Art der Führung der Anregungsstrahlung und nach den benutzten Filtern unterscheiden und einteilen.
Durch- und Auflichtanregung im Hellfeldstrahlengang sind die verbreitetsten Methoden der Fluoreszenzmikroskopie (Bild 6.101 und Bild 6.102). Moderne leistungsfähige Forschungsmikroskope haben beide Möglichkeiten.
Während für spezielle Aufgaben auch Durchlichtanregung im Dunkelfeldstrahlengang verwendet wird (Bild 6.103), hat die Auflicht-Dunkelfeldbeleuchtung geringere Bedeutung, da hierbei der Vorteil der Dunkelfeldanregung nicht so stark wirksam wird. Er besteht darin, daß das meiste nicht absorbierte Erregerlicht auch nicht abgelenkt wird und am Objektiv vorbeigeht, deshalb einen dunklen Bilduntergrund schafft und so die Filter in ihrer Wirkung unterstützt.
Die Wahl zwischen der Anregung im Durchlicht- oder Auflichthellfeld richtet sich nach den Untersuchungsobjekten, den verwendeten Fluorochromen und nach dem nötigen Objektiv. So ist z.B. für opake Objekte Auflichtanregung erforderlich, und auch bei Fluorochromen, die bevorzugt an der Oberfläche des behandelten Werkstoffs reagieren, ist diese Art der Strahlenführung günstig.
Von ausschlaggebender Bedeutung für die Helligkeit des Fluoreszenzbilds ist die Auswahl des Objektivs bzw. seiner numerischen Apertur. Denn während bei Durchlichtanregung die Bestrahlungsstärke der Anregungsstrahlung fast konstant bleibt (vgl. Abschn. 6.1.1.3.), wächst sie bei Auflichtanregung unter Zugrundelegung üblicher Konstruktionsprinzipien mit dem Quadrat der numerischen Apertur des Objektivs. Mit Objektiven großen Abbildungsmaßstabs und hoher numerischer Apertur sind daher bei Auflichtanregung hellere Bilder als bei Durchlichtanregung zu erwarten.

Breitband- und Schmalbandanregung

Bei Verwendung von Glasfiltern großer Halbwertsbreite ($\geqq$ 100 nm) spricht man von Breitbandanregung. Sie ist überall dort möglich, wo Absorptions- und Emissionsmaximum des verwendeten Fluorochrom genügend weit auseinander liegen, so daß noch eine Trennung mit den relativ flachkantigen Glasfiltern möglich ist. Die Fluorochrome Acriflavin, Auramin und Euchrysin sind Anwendungsbeispiele.
Liegen Absorptions- und Emissionsmaxima jedoch eng benachbart ($\leqq$ 50 nm), so ist eine exakte Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung nur möglich, wenn auch erregerseitig sehr steile Kantenfilter (Kurzpaßfilter) verwendet werden.
Wie bereits erwähnt, handelt es sich hierbei um spezielle Vielschichteninterferenzfilter, die in den letzten Jahren für die Fluoreszenzmikroskopie entwickelt wurden. Ihre geringere Halbwertsbreite gegenüber Glasfiltern hat in dem Zusam-

menhang den Begriff Schmalbandanregung hervorgebracht. Der genau festgelegte und relativ schmale Durchlaßbereich der Kurzpaßfilter für die Schmalbandanregung erklärt auch ihre optimale Eignung für meist nur ein Fluorochrom.
Für spezifische fluoreszenzmikroskopische Nachweisverfahren lohnt jedoch der Aufwand in jedem Fall. So sind u.a. für folgende Fluorochrome schon spezielle Kurzpaßfilter entwickelt worden: Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat (TRITC), [beide zum Nachweis immunologischer Reaktionen], Quinacrine mustard (Chromosomenuntersuchungen) sowie zum Nachweis primär fluoreszierender biogener Amine.
Bei der Schmalbandanregung ist eine besonders gute Zuordnung der Erreger- zu den Sperrfiltern wichtig, wobei im Fall der Auflichtanregung auch der spektrale Teilerspiegel in diese Abstimmung einbezogen werden muß.
Ungünstig ist einerseits ein zu großer Abstand der sperrenden Kanten von Erreger- und Sperrfiltern, da dann zuviel Anregungsenergie verschenkt wird. Andererseits läßt ein zu starkes Überlappen der Filtertransmissionen den Untergrund unerwünscht hell erscheinen. Als Richtwert gilt, daß das Produkt der Durchlässigkeiten von Erreger- und Sperrfiltern am Schnittpunkt ihrer Durchlässigkeitskurven zwischen 0 und 0,01% liegen soll.
Unter Umständen müssen mehrere Erregerfilter miteinander kombiniert werden, um den Bereich der Anregungsstrahlung einzuengen (z.B. B 224 + G 241 zur Blauanregung) oder um in einem anderen Bereich noch vorhandene Durchlässigkeiten zu unterdrücken. So haben z.B. die Ultraviolettgläser, die bei Anregung mit Schwerpunkt um $\lambda = 365$ nm verwendet werden, einen zweiten Durchlässigkeitsbereich im Rot. Diese hindurchgelassene Strahlung ist im Verhältnis zur Fluoreszenz-Strahlung so intensiv, daß die Rotfärbung des Sehfelds erheblich stört und eine fotografische oder fotometrische Bildauswertung gänzlich in Frage gestellt wird. Es ist also in der Praxis erforderlich, Ultraviolettgläser mit passenden rotsperrenden Gläsern zu kombinieren, z.B. mit B 226 oder BG 38 der Glaswerke Schott, Mainz, oder mit Gläsern entsprechender Eigenschaften anderer Hersteller. Stets sollte die Dicke dieser Zusatzgläser so gering wie möglich sein, um den unvermeidlichen Lichtverlust niedrig zu halten. Die rotsperrenden Filter, die sich infolge ihrer beträchtlichen Infrarotabsorption stark erwärmen, müssen durch entsprechende Schutzmaßnahmen des Geräte- oder Glasherstellers vor dem Zerspringen bewahrt werden.
Viele Objekte der Fluoreszenzmikroskopie verlieren unter Wirkung langwelligen Ultravioletts ihre Fluoreszenzintensität, sie bleichen aus. Diese Erscheinung tritt besonders bei den Objekten auf, für die ultraviolette Strahlung zur Fluoreszenzanregung nicht erforderlich ist, so daß man in diesen Fällen durch Verwendung eines ultraviolettundurchlässigen Filters Abhilfe schaffen kann. Derartige Filter bewähren sich auch bei der Untersuchung vitalfluorochromierter Objekte, die langwelliges Ultraviolett schlecht vertragen. Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, gibt der VEB Carl Zeiss JENA seinen Filtersätzen einen Filter G 241 von 2 mm Dicke bei. Dieses Glas sperrt langwelliges Ultraviolett bis zur Wellenlänge $\lambda = 375$ nm und verlängert damit die mögliche Beobachtungszeit für ultraviolettempfindliche und supravitale Objekte beträchtlich bzw. schiebt den Beginn von Veränderungen im Objekt hinaus, die durch das langwellige Ultraviolett verursacht werden. Da das Ultraviolettsperrfilter die Gesamtanregungsenergie herabsetzt, kann die Einführung des Filters eine gewisse Herabsetzung der Fluoreszenzhelligkeit verursachen. Ob man diese Helligkeitseinbuße im Interesse einer längeren störungsfreien Beobachtungszeit oder zur Vermeidung von Strahlungsschäden in Kauf nehmen kann, hängt vom Untersuchungsvorhaben ab.
Vielen Filtersätzen für Fluoreszenzmikroskopie werden Dämpfungs-, Neutralfilter, Rauch- oder Graugläser als Blendschutz beigegeben. Sie haben in der Fluoreszenzmikroskopie selbst kaum praktische Bedeutung, es sei denn, es interessiert, wie manche Objekte, z.B. Kristalle, in Abhängigkeit von der Intensität der Anregung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben reagieren. Sonst haben diese Filter nur Bedeutung bei der Prüfung des Strahlengangs der Fluoreszenzeinrichtung oder beim Einsatz der Fluoreszenzeinrichtung für andere Zwecke. Bei solchen Arbeiten müssen allerdings die besonderen Eigenarten der Quecksilberdampflampen, wie Linienspektrum, inhomogener Leuchtkörper, Wechselstromlichtbogen usw., berücksichtigt werden.
Die gebräuchlichsten Sperrfilter sind Anlaufgläser mit besonderen Eigenschaften, sog. Kantenfilter. Ihre Durchlässigkeit muß im Anregungsbereich praktisch Null sein und oberhalb davon, im Emissionsbereich, möglichst steil ansteigen (Bild 6.104). Zur Ausrüstung moderner Fluoreszenzmikroskope gehören mehrere Sperr-

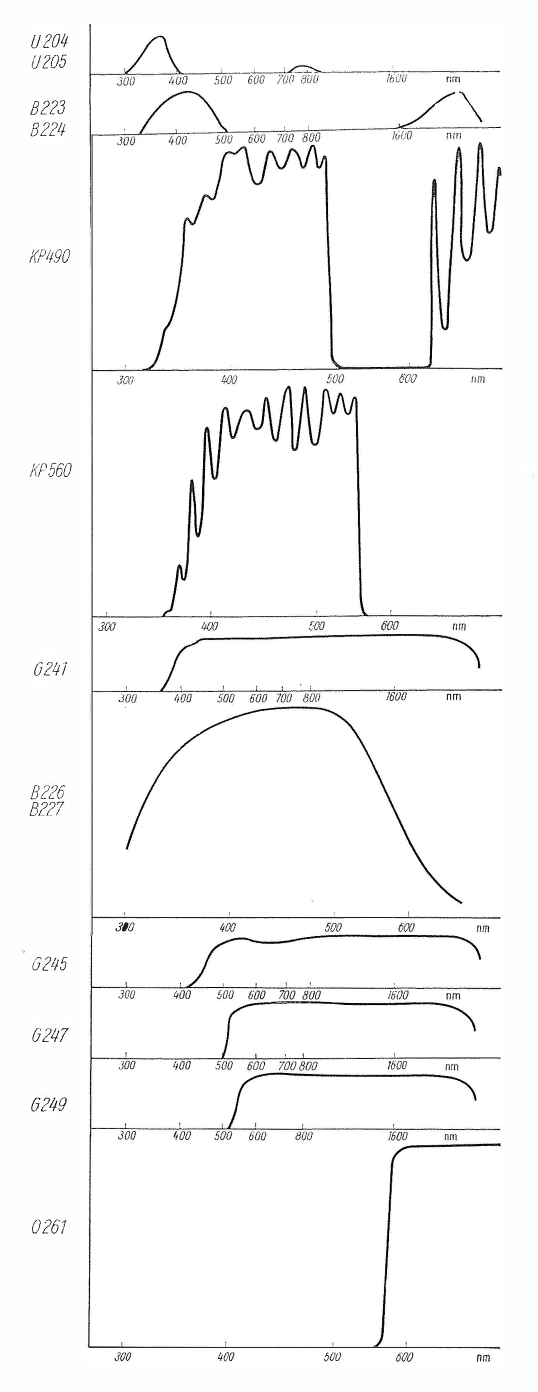


Bild 6.104. Durchlässigkeitskurven von Filtern für die Fluoreszenzmikroskopie

Erregerfilter: U 204, U 205, B 223, B 224, KP 490, KP 560;
UV-Schutzfilter: G 241;
Sperrfilter: G 245, G 247, G 249 O 261;
Rotsperrfilter: B 226, B227

filter für die unterschiedlichen Anregungsverfahren.

Als Sperrfilter für die UV-Anregung dient u.a. ein Glas vom Typ G 245, dessen Durchlässigkeit im Bereich von 400 bis 500 nm von 0 auf 90% ansteigt. Man kann mit diesem Sperrfilter die bei UV-Anregung entstehende blaue Fluoreszenz beobachten. Bei Blau- und Blauviolettanregung benutzt man u.a. die Orangegläser G 249 oder G 247, deren Durchlässigkeit im Bereich von 520 nm bzw. 500 bis 550 nm von 0 auf über 90% ansteigt. Verwendet werden diese Gläser z.B. für die Beobachtung der charakteristisch apfelgrünen Fluoreszenz FITC-markierter Immunpräparate.

Leider haben die für Orangegläser verwendeten Glassorten Eigenfluoreszenz, wenn sie mit langwelligem Ultraviolett bestrahlt werden. Es entsteht so der Eindruck eines orangeroten Schleiers über dem Bild, der den Farbkontrast beeinträchtigt. Um diesen Fehler zu beseitigen, kann man entweder im Anregungsstrahlengang ein UV-Sperrfilter einfügen oder aber vor das fluoreszierende Sperrfilter ein ultraviolettundurchlässiges Glas bringen, das jedoch die Fluoreszenzstrahlung durchlassen muß. Da sich diese Bedingungen mit den Forderungen decken, die an ein Sperrfilter für UV-Anregung gestellt werden, ist der VEB Carl Zeiss JENA dazu übergegangen, vor jedem Sperrfilter für Blauanregung eine G 245-Scheibe mit 1 mm Dicke anzuordnen, die die Eigenfluoreszenz der Orangegläser unterdrückt.

Zur Beobachtung der mit grünem Licht angeregten Rotfluoreszenz kann ein Filterglas vom Typ O 261 eingesetzt werden, dessen Durchlässigkeit erst bei $\lambda = 590$ nm beginnt. Tafel 6.4. enthält in der Fluoreszenzmikroskopie gebräuchliche Filter und -kombinationen und ihr Einsatzgebiet.

6.1.5.4.
Geräte zur Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen können mit üblichen Labor-, Arbeits- oder Routinemikroskopen durchgeführt werden, wenn diese eine Fokussiereinrichtung für den Kondensor und einen Mikroskopierspiegel haben. Mit Apochromaten, Fluoreszenzleuchte und Filtersatz wird ein solches Gerät zum vollwertigen Fluoreszenzmikroskop. Wünschenswert ist weiterhin eine Wechselmöglichkeit für den Tubus, um bei Objekten, deren Fluoreszenzhelligkeit für binokulare Beobachtung zu schwach ist, auf einen monokularen Tubus ausweichen zu können.

Da der binokulare Tubus die Lichtenergie zu

Tafel 6.4. Gebräuchliche Filter und -kombinationen der Fluoreszenzmikroskopie

Anregungsart	Erregerfilter	Sperrfilter	Einsatzgebiet
Ultraviolett (Breitband)	U 204 + B 226 U 205 + B 226	G 245	Untersuchung von Primärfluoreszenzen. Darstellung biogener Amine
Blauviolett	U 205 + B 223 B 224	G 245 + G 247 G 245 + G 249	Untersuchung von Zellen, Kernen, Bakterien, Viren u. a. mit Acridinorange, Auramin, Euchrysin, Tetracyclin usw.
Blau (Breitband)	B 224 + G 241		Chromosomendarstellung mit Quinacrine mustard
Blau (Schmalband)	KP 490 evtl. + B 226	G 245 + G 247	Immunfluoreszenz mit FITC
Grün (Schmalband)	KP 560	O261	Immunfluoreszenz mit TRITC

etwa 50% auf die beiden Okularstutzen verteilt, können in der Fluoreszenzmikroskopie Situationen eintreten, bei denen die Helligkeit der Teilbilder unter den Grenzwert für das Dämmerungssehen sinkt und so eine einwandfreie Beobachtung von Einzelheiten nicht mehr möglich ist. Hier kann man durch Benutzung eines monokularen Tubus weiterkommen, der die Intensitäten der Teilbilder des binokularen Tubus gewissermaßen addiert. Die meisten bedeutenden Mikroskophersteller bieten neben den zur Komplettierung vorhandener Ausrüstungen erforderlichen Geräten besondere Fluoreszenzmikroskope oder Einrichtungen für Fluoreszenzmikroskopie an. Diese Einrichtungen können aus einem Durchlichtuntersatz mit geeigneter Leuchte und Filtermagazin bestehen, oder es sind spezielle Auflichtkondensoren mit Wechselmöglichkeit für Filter und Teilerspiegel (Bild 6.105 und 6.106).
Weit schwieriger werden die Bedingungen, wenn außer Anregung im Durchlicht auch noch Anregung im Auflicht, Kombinationsmethoden oder Mischlichtanregung angestrebt werden. Der hierfür erforderliche technische Aufwand ist mit konventionellen Mikroskopstativen und Zusatzgeräten nicht mehr optimal zu bewältigen, und es entstehen umfangreiche Spezialgeräte, die man als Universalfluoreszenzmikroskope bezeichnen

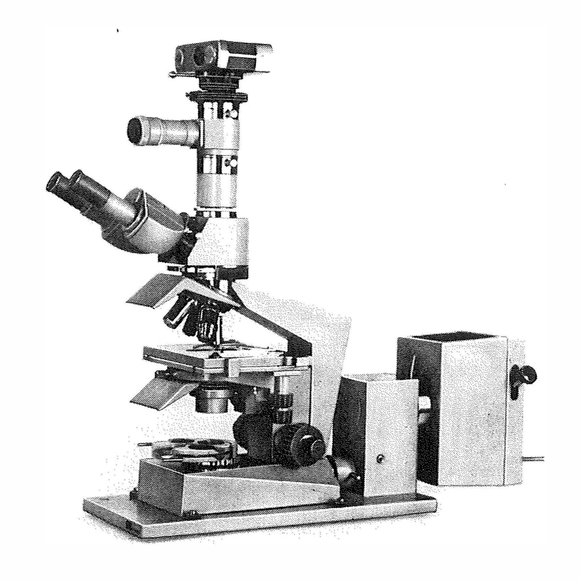
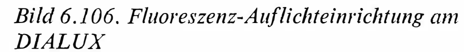


Bild 6.105. Fluoreszenzmikroskop ERGAVAL fl für Durchlichtanregung
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



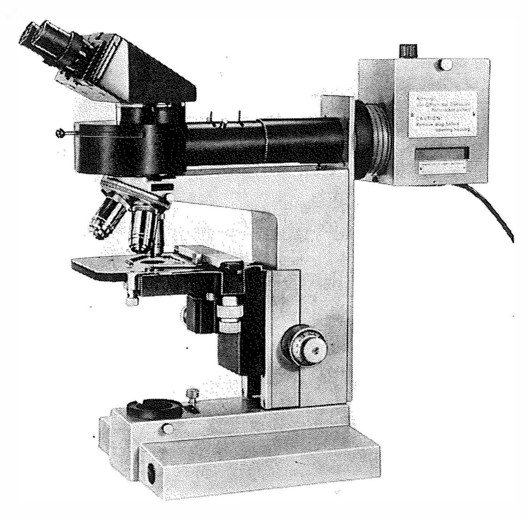


Bild 6.106. Fluoreszenz-Auflichteinrichtung am DIALUX
Firma E. Leitz GmbH, Wetzlar, Werkfoto

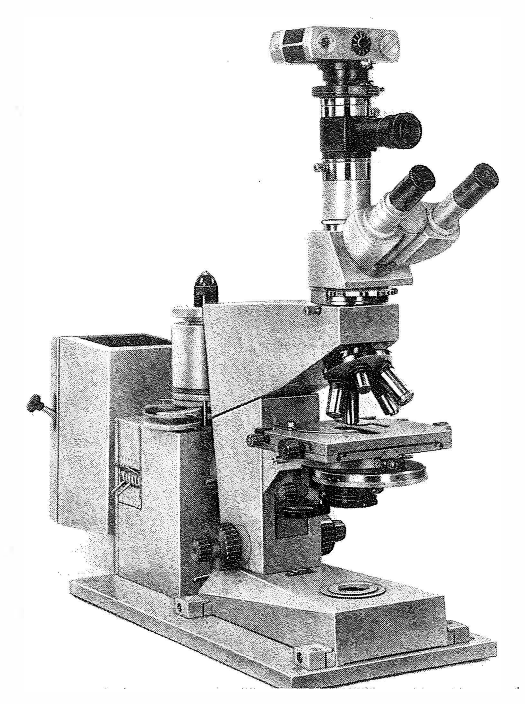


Bild 6.107. Universelles Fluoreszenzmikroskop FLUOVAL für Auflicht- und Durchlichtanregung sowie Kombinationsbeleuchtungsverfahren, Mikrofotografie und Mikroskopfotometrie
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

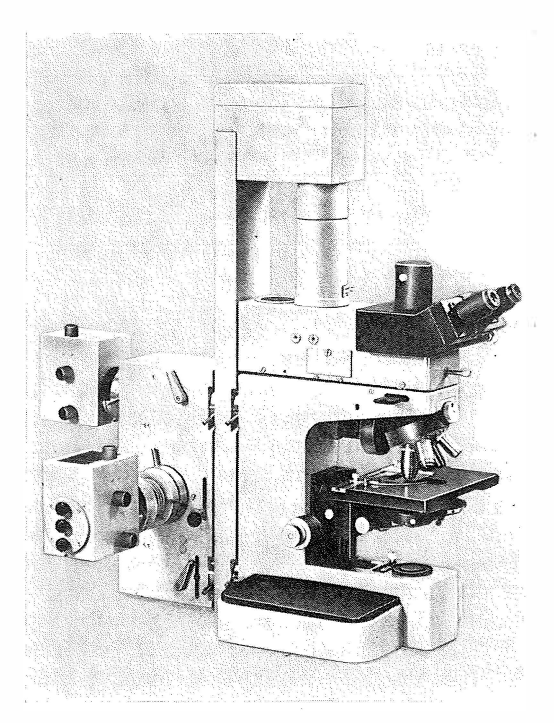


Bild 6.108. MPV 2 in Ausrüstung für Mikro-Fluorometrie
Firma E. Leitz GmbH, Wetzlar, Werkfoto

könnte (Bild 6.107). Derartige Geräte sind neben der Fluoreszenzleuchte noch mit einer Mikroskopierleuchte mit Glühlampe, Vertikalilluminator für Fluoreszenzmikroskopie und technischen Hilfsmitteln zur simultanen oder alternierenden Kombination verschiedener Beleuchtungsverfahren ausgerüstet. Zum Teil sind Fluoreszenzforschungsmikroskope mit Einrichtungen für quantitative Auswertung ausgestattet, z. B. Fotometereinrichtungen zur Messung von Fluoreszenzlichtintensitäten. Diese, auch als Fluorometer bezeichneten Geräte bieten die Möglichkeit zum Anschluß von Registrier- und Speichereinheiten (Bild 6.108). Folgende Untersuchungsmöglichkeiten sind denkbar und mit mehr oder weniger Aufwand durchführbar:

6.1.5.5. Fluoreszenz- und Kombinationsverfahren

Anregung im durchfallenden Licht im Hellfeldstrahlengang
Anregung im durchfallenden Licht im Dunkelfeldstrahlengang
Anregung im auffallenden Licht im Hellfeldstrahlengang
Kombination von Durch- und Auflichtanregung im Hellfeldstrahlengang
Kombination von Dunkelfeld und Fluoreszenz im Durchlicht
Kombination von Durchlichtdunkelfeld mit Auflichtfluoreszenz
Kombination von Phasenkontrast und Fluoreszenz im Durchlicht
Kombination von Durchlichtphasenkontrast mit Auflichtfluoreszenz
Kombination von qualitativer Polarisation mit Fluoreszenz im Durchlicht
Kombination von qualitativer Durchlichtpolarisation mit Auflichtfluoreszenz
Hellfeldbeleuchtung im Durchlicht
Dunkelfeldbeleuchtung im Durchlicht
Phasenkontrast im Durchlicht
qualitative Polarisation im Durchlicht.

Dieser überraschend breite Einsatzbereich wird durch das Vorhandensein verschiedener Leuchten und einer sinnvollen Kombination von ganz-

und teilreflektierenden Spiegeln (Bild 6.109) bewirkt. Ihre Anordnung erfolgt so, daß an den Stellen, in denen ein Beleuchtungsstrahlengang allein seine Richtung ändert, Oberflächenspiegel verwendet werden, und an den Stellen, in denen sich zwei Strahlengänge kreuzen oder vereinigen, teilreflektierende Schichten eingeführt werden, die gleichzeitig Wellenlängenbereiche trennen. Man erreicht so maximale Energieausbeute im Anregungsstrahlengang und zugleich eine Lichtfilterwirkung. Bei geeigneter Anordnung der Strahlengänge läßt sich so die Fluoreszenzanregung im Auflicht mit einer ganzen Reihe von Durchlichtbeleuchtungsverfahren kombinieren, ohne daß man andere als serienmäßige Zusatzeinheiten, wie Phasenkontrasteinrichtung, Dunkelfeldkondensor oder Polarisationseinrichtung, benötigt. Komplizierter wird der Aufbau, wenn die Forderung besteht, Fluoreszenzanregung im Durchlichtstrahlengang mit anderen Durchlichtbeleuchtungsverfahren zu kombinieren.

Die Kombination mit Dunkelfeld ist auf zweierlei Weise zu realisieren: mit der Fluoreszenzleuchte allein, indem man Fluoreszenz im Dunkelfeld-Durchlichtstrahlengang anregt. Dieses Verfahren wird zur Unterdrückung störender diffuser Fluoreszenz im Untergrund serologischer Präparate empfohlen. Durch Ausschalten des Sperrfilters kann man dem Fluoreszenzbild ein Dunkelfeldbild in der Farbe der Anregungsstrahlung überlagern, wenn man Blauviolett- oder Blauanregung benutzt. Diese Methode hat sich z.B. zur Differenzierung von Treponema-Stämmen bewährt, die sich durch serologische Reaktionen unterscheiden. Sie erfordert bei der Arbeit im Bereich der Immersionsvergrößerungen ein Objektiv mit Irisblende, um den Dunkelfeldeffekt zu erreichen. Das Verfahren läßt sich auch an einer aus Mikroskop und Leuchte zusammengestellten Ausrüstung durchführen, doch lohnt der Versuch kaum ohne eine Anregungslichtquelle HBO 200.

Das zweite Verfahren benutzt zwar auch den Dunkelfeldkondensor zur Fluoreszenzanregung, führt die Anregungsstrahlung aber über einen bevorzugt im kurzwelligen Spektralbereich reflektierenden Teilerspiegel und überlagert diesem Strahlengang von unten her einen Dunkelfeldstrahlengang unter Benutzung einer Glühlampe. Gegenüber dem erstbeschriebenen Verfahren gewinnt man so die Vorteile der Kombination auch mit Ultraviolettanregung, der Möglichkeit, die Dunkelfeldobjekte mit Farbfiltern gegenüber den Fluoreszenzobjekten zu kontrastieren, und der besseren Ausleuchtung im Dunkelfeld, denn die inhomogene Strahlungsquelle HBO 200 ist als Lichtquelle für Dunkelfeld nicht ideal.

Die Kombination mit dem Phasenkontrastverfahren ist ebenfalls auf zweierlei Art möglich:

Die erste Art ist die Durchführung des Fluoreszenzverfahrens durch Auflichtanregung und des Phasenkontrastverfahrens mit einer serienmäßigen Einrichtung im Durchlicht. Voraussetzung ist ein Mikroskopstativ, an dem gleichzeitig Durchlichtbeleuchtung mit einer eingebauten

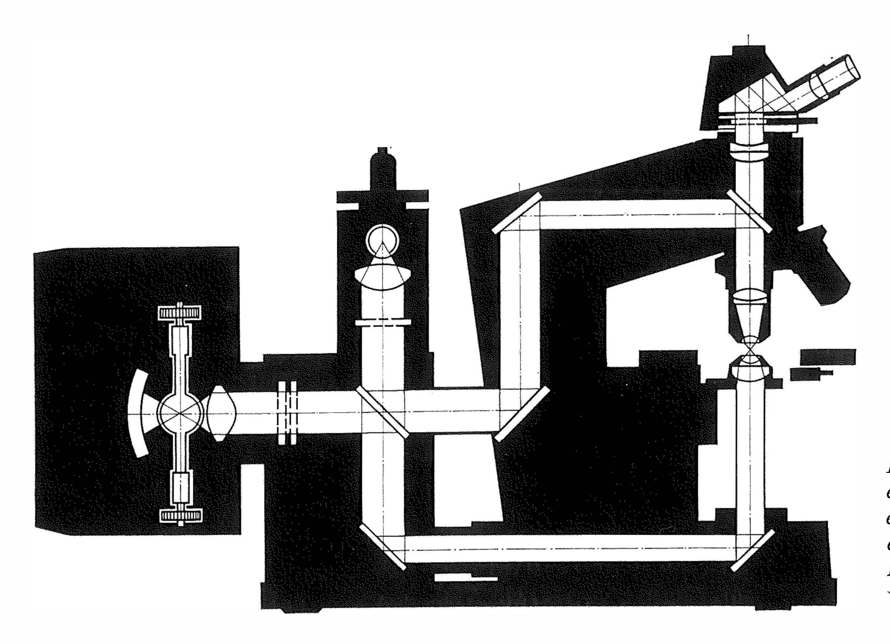


Bild 6.109. Schema eines universell einsetzbaren Fluoreszenzmikroskops FLUOVAL
VEB Carl Zeiss JENA

Lichtquelle, einer Ansteckleuchte oder einer üblichen Mikroskopierleuchte und Auflicht mit einem Vertikalilluminator, der als Umlenk- und Strahlenteilungselement einen Teilerspiegel enthält, möglich sind. Für die Fluoreszenzanregung bildet man den Spiegel so aus, daß er die Anregungsstrahlung reflektiert und das Fluoreszenzlicht durchläßt. Ein typischer Vertreter dieser Geräteart ist der Opak-Illuminator OI-17 des Werkes LOMO, Leningrad. Da dieser Illuminator auf den Tubusträger aufgesetzt wird, gestattet er die Verwendung des serienmäßigen Objektivrevolvers. Eine andere technische Lösung wird im Bild 6.106 gezeigt. Hier wurde der Opak-Illuminator eingebaut. Diese Bauart hat den Vorteil bequemer und dauerhafter Justierung durch den Benutzer. Die eben beschriebene Anordnung erlaubt sowohl die Beobachtung fluoreszierender Objektdetails als auch nichtfluoreszierender Phasenstrukturen, die eine Erweiterung der Aussage über das mikroskopische Bild ermöglichen. Bedingung ist, daß die Helligkeit des Phasenkontrastbilds der des Fluoreszenzbilds, z. B. durch einen Regeltransformator angepaßt werden kann.

Die alternative Anwendung von Fluoreszenzanregung im Auflicht und Phasenkontrast im Durchlicht hat große Bedeutung in der Fluorometrie erlangt. Die Intensitätsabnahme vieler fluoreszierender Objekte sofort ab Beginn der Bestrahlung behaftet jede Messung mit einem nicht unbedeutenden Fehler. Die oft vorhandene Möglichkeit, bei Glühlampenlicht im Phasenkontrast die zu messende Objektstelle auszuwählen und erst unmittelbar bei Meßbeginn mit der Objektanregung einzusetzen, ermöglicht auch das Fotometrieren schnell ausbleichender Präparate.

Die zweite Art ist die Durchführung von Fluoreszenz- und Phasenkontrastverfahren, beide im durchfallenden Licht mit einer oder zwei Lichtquellen. Beide Varianten erfordern eine spezifische Ausbildung des Phasenkontrastkondensors, bei der die Ringblende aus Erregerfilterglas oder -folie hergestellt wird. Das Einsatzgebiet dieser Geräte ist jedoch sehr begrenzt und hat daher auch kaum Bedeutung erlangt.

Die wesentlich seltener erforderliche Kombination Polarisation–Fluoreszenz [218] ist mit einer gemeinsamen Lichtquelle ganz unmöglich, weil beide Teilverfahren im Hellfeldstrahlengang arbeiten und deshalb das Sperrfilter das mit Anregungsstrahlung entworfene Polarisationsbild auslöscht und bei Weglassen des Sperrfilters das Fluoreszenzbild stark überstrahlt wird. Abgesehen davon, ist die kurzwellige Erregerstrahlung den handelsüblichen Filterpolarisatoren keineswegs zuträglich. Die Kombination Polarisation–Fluoreszenz ist demnach nur unter Auflichtfluoreszenzanregung realisierbar.

6.1.5.6. Mikroskopzubehör und Präpariertechnik

Zur Präpariertechnik für die Fluoreszenzmikroskopie sind gegenüber Abschn. 6.1.9. nur einige ergänzende Bemerkungen erforderlich. Auch an das konventionelle Mikroskopzubehör, wie Objektträger, Objektkammern, Deckgläser, Einbettungsmittel, Immersionsflüssigkeit u. a., werden in der Fluoreszenzmikroskopie keine anderen Anforderungen gestellt als bei sonst üblichen Mikroskopierverfahren. Lediglich die Forderung nach Freiheit von Eigenfluoreszenz muß hier zusätzlich erhoben werden. Sie ist im allgemeinen bei Objektträgern und Deckgläsern erfüllt.

Die Prüfung auf Eigenfluoreszenz ist einfach. Man mikroskopiert die Gläser unter dem Fluoreszenzmikroskop. Um die Einstellebene zu markieren, legt man ein paar fluoreszierende Kristallstäubchen, wie Anthrazen, Zinkoxid, Quecksilberchlorür, oder in Fluorochromlösung getauchte Fließpapierfasern auf den Objektträger. Man kann auch einen Strich mit rotem Fettstift anbringen, der gewöhnlich tiefrot fluoresziert. Diese Objekte sollen möglichst klein sein und in möglichst großen Abständen liegen, damit ihre relativ intensive Fluoreszenz nicht die erfahrungsgemäß schwache Eigenfluoreszenz der Gläser überstrahlt. Es ist auch anzuraten, bereits benutzte und zur Wiederverwendung gereinigte Gläser vor der Benutzung in der Fluoreszenzmikroskopie auf die beschriebene Weise zu prüfen, ob die Reinigung gründlich genug vorgenommen wurde oder ob noch verbliebene Rückstände Fluoreszenz verursachen. Da geringe Substanzmengen u. U. starke Fluoreszenz zeigen, können derartige Rückstände bei weiteren Untersuchungen stören.

Analog kann man das Fluoreszenzverhalten von Einbettungsmittel, Einschlußmasse und Immersionsflüssigkeit testen. Für lebende und tote, aber nicht konservierte Objekte eignet sich Wasser bzw. die Kulturflüssigkeit, soweit nicht einzelne Komponenten oder Stoffwechselprodukte fluoreszieren. Zwingt die Methodik, Objekte in einem solchen Substrat zu untersuchen, kann man nur versuchen, durch UV-Sperrfilter oder Anregung im Dunkelfeld- oder Auflichtstrahlengang die Untergrundfluoreszenz herabzusetzen.

Für die Konservierung werden überall wäßrige Formollösung, Formalindämpfe, Formolalkohol und Carnoy-Gemisch empfohlen [225]. Als unbrauchbar gelten dagegen alle quecksilber- und eisenhaltigen Fixiermittel, weil sie die Fluoreszenzeigenschaften der Objekte unkontrollierbar beeinflussen. Wenn Eigenfluoreszenz beobachtet werden soll, müssen außerdem noch alle anderen Schwermetallsalze und die Pikrinsäure vermieden werden. Die Lösungen der Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluorochrome sind, bedingt durch die chemischen Eigenschaften der Substanzen, sehr empfindlich gegen Schwankungen des pH-Werts. Unachtsamkeit in dieser Hinsicht kann zu Überraschungen hinsichtlich der beabsichtigten Farbeffekte und der Haltbarkeit der Präparate führen. Von großer Bedeutung vor allem für das Gelingen physiologisch-chemischer, histochemischer und verwandter Experimente kann die Beachtung der Absorptions- und Emissionseigenschaften der benutzten Fluorochrome, Fluoreszenzindikatoren, Reagenzien u.a. sein. Als theoretische Hilfsmittel sei auf die in der Literatur veröffentlichten Tafeln, Kurven und Vorschriften hingewiesen [219] [226] [242].

Der Behandlung der Objekte mit stark verdünnten Lösungen über längere Zeit gegenüber der kurzzeitigen Färbung mit höherkonzentrierten Lösungen ist der Vorzug zu geben. Diese Regel gilt sowohl für die Vitalfluorochromierung als auch für die Behandlung fixierter Objekte.

Wesentlich für die Erzielung kontrastreicher Bilder ist die restlose Entfernung allen überschüssigen Farbstoffs aus den Präparaten. Die Fluoreszenzmikroskopie ist in diesem Punkt empfindlicher als die Hellfeldmikroskopie. Da Fluorochrome in wesentlich geringeren Konzentrationen als Diachrome zufriedenstellende Wirkung zeigen, stören auch wesentlich geringere Restmengen im Objekt. Darum ist dem Auswaschen nach der eigentlichen Fluorochromierung große Sorgfalt zu widmen. Da Alkohol, vor allem in der Konzentration 70%, Fluorochrome stark extrahiert, kann gegebenenfalls auch die Technik der Überfärbung und nachfolgenden Differenzierung benutzt werden.

Fixiertes und konserviertes Material läßt sich außer in Wasser auch in fluoreszenzfreiem Glyzerin oder Paraffinöl beobachten. Es genügt, wenn sie der Güteklasse DAB VII entsprechen. Paraffinöl kann natürlich bei der Untersuchung fettlöslicher Substanzen nicht verwendet werden. Es hat auch die unangenehme Eigenschaft, auf die Dauer manche Fluorochrome zu extrahieren, so daß die Leuchtkraft der Präparate merklich nachläßt und der in das umgebende Medium übergetretene Farbstoff eine Untergrundfluoreszenz hervorruft, die den Kontrast stark beeinträchtigt.

Der Einsatz von fluoreszenzfreiem Immersionsöl als Einschlußmittel kann nicht ohne Einschränkung empfohlen werden, weil derartige Flüssigkeiten Substanzen enthalten, die u.U. Fluorochromierungen angreifen.

Zum Herstellen von Dauerpräparaten kommen Kanada- und Neutralbalsam und deren Derivate sowie Glyzeringelatine wegen erheblicher Eigenfluoreszenz nicht in Frage.

Sehr gut geeignet sind die neu entwickelten fluoreszenzfreien Schnelleinschlußmittel für Mikroskope, z.B. Entellan ($n = 1{,}501$), Eukitt ($n = 1{,}491$) und Caedax. Die damit angefertigten Präparate sind schon nach einigen Minuten soweit ausgehärtet, daß sie ohne Bedenken mikroskopiert werden können.

Fluorochromierte Präparate sind bei sorgfältiger Behandlung und Aufbewahrung (kühl und dunkel) oft monatelang haltbar.

Allgemeine Hinweise zur Präparier- und Färbetechnik gibt [225] und [243].

6.1.5.7. Einsatzgebiete der Fluoreszenzmikroskopie

In der Entwicklung ihrer wissenschaftlichen Bedeutung hat die Fluoreszenzmikroskopie ein ähnliches Schicksal erfahren wie z.B. das Phasenkontrastverfahren. Zuerst zögernd, dann in immer lebhafterem Tempo vollzog sich die Einführung; es folgte die Periode der Erprobung der Methode auf allen möglichen mikroskopischen Arbeitsgebieten mit der beinahe obligaten Erscheinung, daß in der Begeisterung über das Neue über das Ziel hinausgeschossen und von der Methode etwas gefordert wurde, was sie nicht bringen konnte. So haben sich die Hoffnungen, die man in die Möglichkeit setzte, mit einzelnen Fluorochromen Mehrfachfärbungen zu erzielen [225], und die Erwartung, mit dem Acridinorangeverfahren eine ganz einfache Technik zur Unterscheidung lebender und toter Zellen in der Hand zu haben, nicht im anfänglich erhofften Ausmaß erfüllt [248]. Auch in der Geschwulstforschung [211] und Tuberkulosediagnose sind die Ergebnisse offenbar hinter den Erwartungen zurückgeblieben [208]. Ähnlich scheint sich die Situation in der Hämatologie zu entwickeln [217] [233]. Unzweifelhaften Gewinn jedoch hat die Fluoreszenzmethodik für jede Art von Vitalmikroskopie gebracht. Die hohe Effektivität der Vitalfluoro-



Bild 6.110. Ruhende und keimende Sporen von Anobaena variablis

Primärfluoreszenz durch Blauanregung. M 200 : 1/Durchlicht

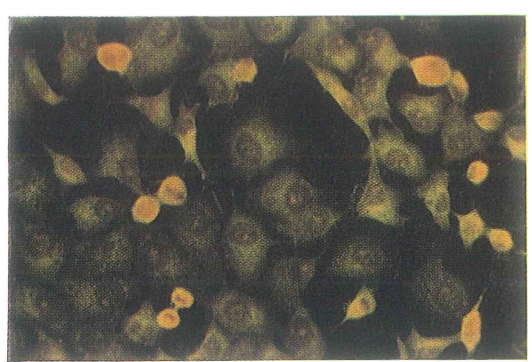


Bild 6.112. Polyomyelitis-Viren auf FL-Zellen

FITC-Technik im Auflicht. M 200 : 1

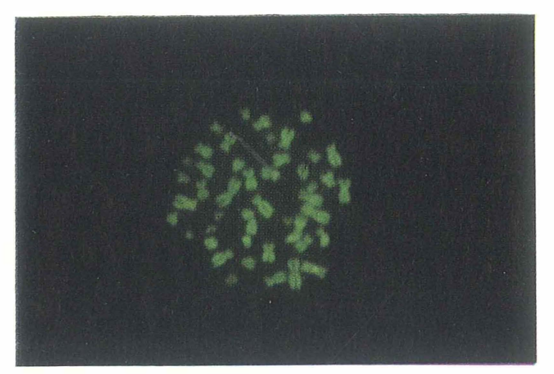


Bild 6.111. Menschliche Chromosomen in der Methaphase mit hell leuchtenden Y-Chromosomen

Quinaerine mustard mit Blauanregung. M800 : 1/Auflicht

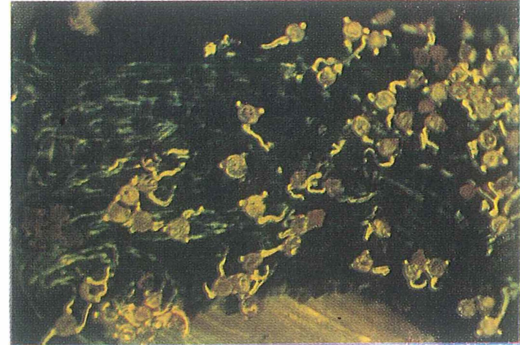


Bild 6.113. Keimende Pollen auf Narbe von Weideröschen

Anilinblau-Färbung mit Blauanregung M 50 : 1/Durchlicht

chrome, allen voran das Acridinorange, und ihre überraschend gute Verträglichkeit sichern aller Voraussicht nach diesem Verfahren ein dauerndes Arbeitsfeld [247]. Von ähnlicher Bedeutung für biochemische Untersuchungen scheinen manche Indikatorsubstanzen unter den Fluorochromen zu sein. Es gibt umfangreiche Listen von Indikatoren für praktisch alle pH-Bereiche, z. B. [225].

Zum umfangreichsten und wichtigsten Anwendungsgebiet der fluoreszenzmikroskopischen Nachweisverfahren ist die Mikrobiologie von Zelle und Gewebe geworden [249] [252]. Mit Hilfe spezieller Fluorochromierungen können Strukturen und Substanzen nachgewiesen und lokalisiert werden. Größte Bedeutung hat hierbei die Immufluoreszenz erlangt, die auf der Darstellung der serologischen Antigen – Antikörper – Reaktion beruht. Zahlreiche Methoden der Fluoreszenz-Antikörpertechnik haben schon als Routinemethoden in Laboratorien Eingang gefunden und sind entscheidend für die Diagnose solcher Erkrankungen, wie Masern, Tollwut, Pocken, Herpes, Polio, Syphilis usw., geworden [214] [215] [216] [221] [223] [224] [229] [235] [236] [250]. Fluoreszenzmikroskopische Methoden werden angewandt in der Humangenetik zur Identifikation von Chromosomen und deren Aberrationen [213] [239] [253].

In der Physiologie werden auf fluoreszenzmikroskopischem Wege biogene Amine nachgewiesen [220] [241], und die Ophthalmologie bedient sich ihrer beim Auffinden von Netzhautschäden [228]. Anwendungsgebiete im weitesten Sinne bilden Mineralogie und Geologie [237] [238]. Anwendungsbeispiele geben die Bilder 6.110 bis 6.113.

Mit Verlagerung der Einsatzgebiete der Fluoreszenzmikroskopie in Untersuchungen, die sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen for-

dern, gewinnt die fotometrische Messung immer größere Bedeutung [219]. Über die Ermittlung von Fluoreszenzlichtintensitäten können Stoffmengen bestimmt (DNS, Proteine) oder ablaufende und abgelaufene biochemische Prozesse wahrgenommen und lokalisiert werden [208] [212] [232] [244].

Die Fluoreszenzmikroskop-Fotometrie oder Fluorometrie bildet die Grundlage für eine vollautomatische Messung, Registrierung und statistische Auswertung von fluoreszenzmikroskopischen Präparaten. Sie stellt für den Mediziner und Biologen ein wichtiges Hilfsmittel für Forschung und Routineuntersuchungen dar.

Eine Schwierigkeit ist z. Z. noch das Ausbleichen der Präparate unter dem Einfluß der Erregerstrahlung, wodurch jede Messung mit einem Fehler behaftet ist [245].

Ein anderes Problem ist die Schaffung eines Fluoreszenzstandards, der es ermöglicht, unabhängig von der verwendeten Apparatur und den sich z. T. stark unterscheidenden Chargen der Fluorochrome bzw. fluoreszenzmarkierten Eiweiße stets miteinander vergleichbare reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen [227] [230] [246] [251].

Die Mikrofotografie wird wegen der geringen Helligkeit der Fluoreszenzbilder vorwiegend im Kleinbildformat durchgeführt. Aus dem gleichen Grund ist auch erklärlich, weshalb die Benutzung von Belichtungsautomaten in der Fluoreszenzmikroskopie gelegentlich Schwierigkeiten bereitet. Weitere Besonderheiten sind der Dunkelfeldcharakter der Fluoreszenzbilder, der in manchen Fällen die Verwendung von Belichtungsmeßeinrichtungen erschwert, und die spektrale Zusammensetzung des Fluoreszenzlichts, die für Farbaufnahmen in der Regel Tageslichtmaterial verlangt [231]. Da für die fotografische Dokumentation in der Fluoreszenzmikroskopie sonst die gleichen Bedingungen gelten wie für die meisten anderen Beobachtungsverfahren, sei für diesen Komplex auf den Abschn. 8. verwiesen.

6.1.6. Mikroskopie mit unsichtbaren Strahlen

von Dr. rer. nat. *Horst Riesenberg*

6.1.6.1. Einführung

Obwohl die Mikroskopie im sichtbaren Spektralbereich den weitaus überwiegenden Teil der Mikroskopie ausmacht, sind mikroskopische Untersuchungen im infraroten (IR) und ultravioletten (UV) Spektralbereich üblich und erlangen zunehmende Bedeutung. Die Bedeutung der Mikroskopie mit unsichtbaren Strahlen hat mehrere Gründe. Ein wesentlicher Grund besteht darin, daß viele wichtige Substanzen, aus denen mikroskopische Objekte bestehen, in bestimmten nicht sichtbaren Spektralgebieten selektive Absorptionen zeigen, während sie im sichtbaren Gebiet vollständig durchlässig sind oder in manchen Fällen zu stark absorbieren. Je nach dem Absorptionsverhalten der Objekte ist dann die UV-Mikroskopie oder die IR-Mikroskopie oder auch die Röntgenmikroskopie das angemessene mikroskopische Verfahren, wenn es darauf ankommt, die Objekte ohne künstliche Eingriffe (z.B. Färbemethoden) zu untersuchen und Kontrastierungsverfahren, wie Phasenkontrast- oder Interferenzkontrastverfahren, zu vermeiden, bei denen die Kontraste nicht aufgrund von spezifischen Absorptionen der Substanzen, sondern aufgrund von Brechzahl- oder Gangunterschieden entstehen. Die Absorption beim Durchtritt von Strahlung durch Materie hat unterschiedliche Ursachen. Im Gebiet der Röntgenstrahlen ist die Absorption elementspezifisch. Durch Absorption von Lichtquanten ergeben sich energetische Änderungen in den inneren Schalen der Elektronenhülle des Atoms. Im Gebiet des ultravioletten, sichtbaren und infraroten Spektralbereichs absorbieren die Moleküle, wobei durch Absorption von Lichtquanten energetische Änderungen in dem äußeren Elektronensystem, d.h. in den Zuständen der Valenzelektronen eines Moleküls und in der Rotations- und Schwingungsenergie der Moleküle auftreten. Ein weiterer Grund für die Mikroskopie mit unsichtbaren Strahlen im IR-Bereich bildet das Emissionsverhalten von Stoffen, das z. B. zur Temperaturmessung mikroskopisch kleiner Bereiche genutzt wird.

Der sichtbare und die unsichtbaren Spektralbereiche werden durch die Angabe von Wellenlängen gegeneinander abgegrenzt. Die Grenzen des sichtbaren oder visuellen Spektralbereichs (VIS) sind durch die spektrale Hellempfindlichkeitskurve des Auges, die sog. V_λ-Kurve (Bild 6.114 und Tafel 6.5), bedingt und werden mit etwa 400 und 760 nm angegeben. Innerhalb dieses Bereichs nimmt das (Durchschnitts-) Auge Strahlung wahr und bewertet ein energiegleiches Spektrum hinsichtlich der empfundenen Helligkeit nach der V_λ-Kurve. Die verlaufenden Grenzen dieser Kurve schließen die Möglichkeit ein, daß unter günstigen Umständen auch Strah-

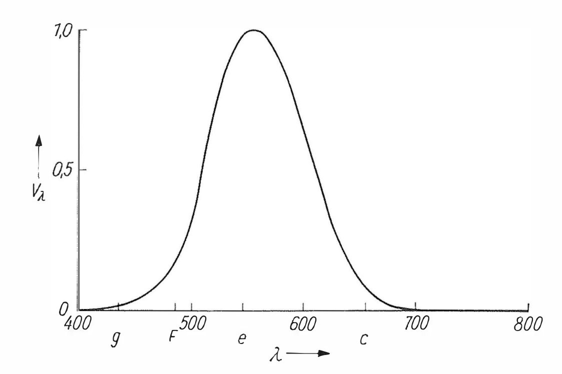


Bild 6.114. Spektrale Hellempfindlichkeitskurve des Auges (für Tagessehen), sog. V_λ-Kurve

Tafel 6.5. Werte für die V-Kurve nach Bild 6.114

λ nm	V_λ	λ nm	V_λ
400	0,0004	580	0,870
410	0,0012	590	0,757
420	0,0040	600	0,631
430	0,0116	610	0,503
440	0,023	620	0,381
450	0,038	630	0,265
460	0,060	640	0,175
470	0,091	650	0,107
480	0,139	660	0,061
490	0,208	670	0,032
500	0,323	680	0,017
510	0,503	690	0,0082
520	0,710	700	0,0041
530	0,862	710	0,0021
540	0,954	720	0,00105
550	0,995	730	0,00052
555	1,000	740	0,00025
560	0,995	750	0,00012
570	0,952	760	0,00006

lung außerhalb der angegebenen Grenzwellenlängen wahrgenommen werden kann.
Betrachtet man die elektromagnetische Strahlung über mehrere Zehnerpotenzen der Wellenlänge (Bild 6.115), so fällt auf, daß der visuelle Bereich nur einen engen Ausschnitt aus dem elektromagnetischen Spektrum darstellt. Nach kürzeren Wellenlängen schließt sich der ultraviolette Bereich (UV) bis etwa 200 nm an, dem der Bereich des Vakuum-UV (VUV) folgt, der dadurch gekennzeichnet ist, daß die ultraviolette Strahlung unterhalb 200 nm von der Luft, besonders durch Sauerstoff, absorbiert wird. Da die Größe der Absorption von der durchlaufenen Wegstrecke abhängt, ist die Angabe der Grenzwellenlänge zwischen dem UV- und dem VUV-Gebiet nicht ohne Willkür. Man gibt deshalb gelegentlich anstelle von 200 nm auch 185 nm als Grenzwellenlänge an. Die kurzwellige Grenze des Vakuum-UV liegt etwa bei 10 nm – einige Autoren geben 4 nm an – und damit bereits im Bereich der extrem weichen Röntgenstrahlung, der bis etwa 30 nm reicht.
Für biologisch-medizinische Zwecke, z. B. für die Therapie mit ultravioletten Strahlen, ist es üblich, das ultraviolette Spektrum noch weiter zu unterteilen in das UV-A-Gebiet von 400 bis 315 nm, das UV-B-Gebiet von 315 bis 280 nm und das UV-C-Gebiet von 280 bis 200 nm. Für die UV-Mikroskopie ist diese Unterteilung nicht üblich. Der Bereich von 185 bis 125 nm wird das Schumann-Gebiet genannt, nach *V. Schumann*, der diesen Spektralbereich zuerst erforscht hat. Das Schumann-Gebiet ist ein Teil des Vakuum-UV. Die untere Grenze von 125 nm rührt daher, daß experimentelle Anordnungen mit Flußspatoptik bis etwa 125 nm durchlässig sind, wenn sie im Vakuum benutzt werden.
Die Röntgenstrahlen umfassen den Wellenlängenbereich von etwa 10^{-4} bis 30 nm. Etwa von 0,3 nm ab werden die Röntgenstrahlen von der Luft stark absorbiert. Diese extrem weiche Röntgenstrahlung kann deshalb auch als das Vakuumröntgengebiet bezeichnet werden, das das Gebiet des Vakuum-UV z. T. überlappt. Eine Röntgenmikroskopie in Analogie zur üblichen Lichtmikroskopie ist nur bedingt möglich. Sie ist beschränkt auf die Abbildung mit Spiegeln und auf Röntgenwellenlängen, die bei 1 nm oder darüber liegen.
Die elektromagnetische Strahlung, die sich nach größeren Wellenlängen hin an den visuellen Be-

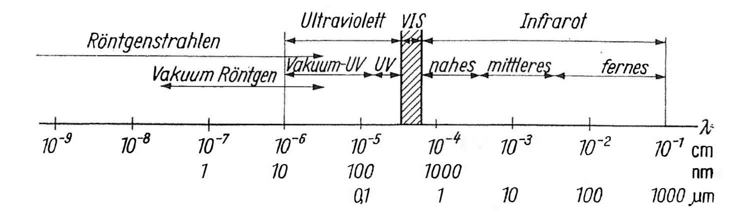


Bild 6.115. Ausschnitt aus dem elektromagnetischen Spektrum

reich anschließt, nennt man das Infrafot (IR). Die Bezeichnung Ultrarot (UR) sollte im Interesse des internationalen Sprachgebrauchs nicht verwendet werden. Die langwellige Grenze des Infraroten wird bei etwa 1 mm angesetzt, so daß der IR-Bereich den Bereich der nach elektrischen Verfahren erzeugten sehr kurzen Wellen überlappt. Den IR-Bereich unterteilt man in das nahe Infrarot von 0,76 bis 3 μm, in das mittlere Infrarot von 3 bis 25 μm und in das ferne Infrarot > 25 μm.

6.1.6.2. UV-Mikroskopie

Zum Erzeugen von UV-Strahlung für die UV-Mikroskopie sind verschiedene Strahlungsquellen gebräuchlich, z. B. die im Abschn. 5. beschriebenen Xenon-Höchstdrucklampen und die Quecksilber-Höchstdrucklampen. Die Deuteriumlampen haben für Untersuchungen im UV eine sehr günstige spektrale Emissionsverteilung, doch liegt ihre Strahldichte bei 260 nm noch unterhalb der der Höchstdrucklampen. Durch höhere Leistung und Wasserkühlung konnte die Strahldichte der Deuteriumlampen verbessert werden.
Zur spektralen Zerlegung der von den Strahlungsquellen emittierten Strahlung dienen Monochromatoren oder Filter. Als Filter kommen Filtersysteme in Betracht, die aus Filtergläsern, Flüssigkeitsfiltern oder UV-Interferenzfiltern bestehen [291] [314] [336] [354] [360] [373]. Die abbildende Optik muß UV-durchlässig sein. Außer Spiegeln können Quarzglas, Flußspat und Lithiumfluorid verwendet werden. Als Mikroskopobjektive sind UV-VIS-apochromatische und UV-VIS-achromatische Objektive geeignet (s. Abschn. 2.5.3.).
Um das UV-Bild im Mikroskop sichtbar zu machen, ist eine Bildwandlung erforderlich. Die einfachste Art der Bildwandlung ist mit einem fluoreszierenden Glasplättchen möglich, auf das das UV-Bild fokussiert und durch Fluoreszenz in sichtbares Licht umgewandelt wird. Ein spezieller UV-Sucher mit Fluoreszenzbildwandlung, der das aus dem Monochromator stammende störende Streulicht aus dem Strahlengang durch ein Prisma entfernte, wurde von *Köhler* eingeführt, der auch das erste UV-Mikroskop entwickelte [296]. Das Prinzip der Fluoreszenzbildwandlung konnte durch Entwicklung eines speziellen UV-Tubus wesentlich verbessert werden, in dem das ultraviolette Bild durch eine lichtoptische Verstärkung erheblich heller erscheint und dabei Störungen durch Streulicht wie beim Köhlerschen UV-Sucher vermieden werden. Das Optikschema des UV-Tubus ist auf der linken Hälfte von Bild 6.116 dargestellt.
Das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild des mikroskopischen Objekts O wird durch ein achromatisches UV-durchlässiges optisches System verkleinert auf einen Fluoreszenzschirm bei O'_L mit hoher Bestrahlungsstärke abgebildet, wodurch das ultraviolette Bild kontrastrichtig in ein helles, sichtbares Bild umgewandelt wird. Durch ein nachgeordnetes Mikroskop mit relativ hoher Apertur wird das Fluoreszenzbild wieder vergrößert abgebildet, so daß es in der förderlichen Vergrößerung erscheint, jedoch mit einem wesentlich größeren Durchmesser der Austrittspupille, als es sonst bei der förderlichen Vergrößerung üblich ist. Die Austrittspupille ist der Augenpupille beim Beobachten des UV-Bilds angepaßt. Ein mit dem Fluoreszenzschirm verbundenes Prisma beseitigt die Strahlung aus dem Strahlengang, die nicht zur Fluoreszenzbildwandlung beiträgt und deshalb unerwünscht ist, z. B. sichtbares Licht aus Filterfehlern, sichtbares Streulicht aus Monochromatoren und langwellige UV-Strah-

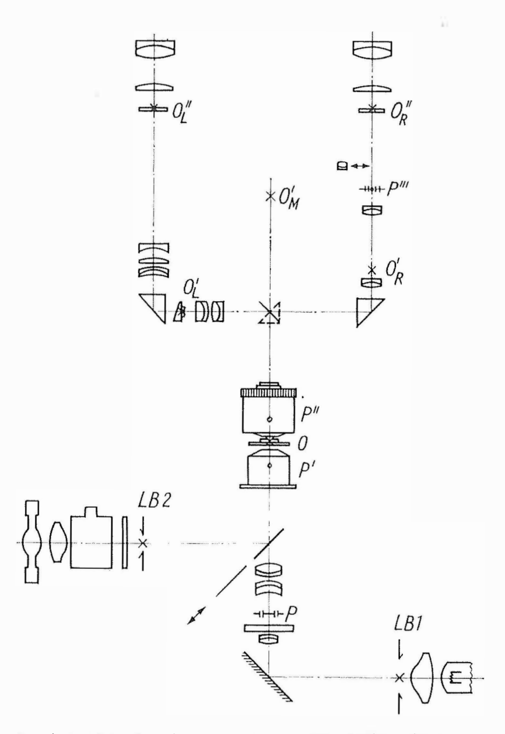


Bild 6.116. Optikschema zum UV-Mikroskop
links: spezieller UV-Tubus mit lichtstarker Fluoreszenzbildwandlung;
rechts: Phasenkontraststrahlengang, Ringblenden bei P', Phasenringe bei P'''
VEB Carl Zeiss JENA

lung. Ein Komafehler, der durch das mit dem Fluoreszenzschirm verbundene Prisma entsteht, wird durch geeignete Wahl des nachfolgenden Prismas kompensiert. Man erhält im Vergleich zu bisher bekannten Fluoreszenzbildwandlern ein helles und kontrastreiches UV-Bild, das außerdem ohne Gefahr einer Augenschädigung beobachtet werden kann.

Bedeutend aufwendiger sind elektronische Bildwandler [276] [279] [284], die zum Betrieb ein Hochspannungsgerät erfordern. Das UV-Bild wird auf die Fotokatode des Bildwandlers abgebildet, aus der durch die auftretenden Photonen Elektronen ausgelöst werden. Diese werden durch ein Hochspannungsfeld beschleunigt und elektronenoptisch auf einen Leuchtschirm abgebildet, wobei ein sichtbares Bild entsteht.

Neben der Sichtbarmachung des UV-Bilds durch einen Fluoreszenzbildwandler oder einen elektronischen Bildwandler, die einen raschen Überblick über die Absorptionsstruktur des Präparats gewährleisten und zur genauen Einstellung der gewünschten Präparatstelle dienen – die Schärfeneinstellung ist aufgrund der geringeren Einstelltoleranz im ultravioletten Licht genauer als im sichtbaren Licht (s. Abschn. 2.4.2.) –, ist es in der UV-Mikroskopie wesentlich, die vorbereitenden mikroskopischen Arbeiten, wie das Aufsuchen und Einstellen von Präparatstellen, im sichtbaren Licht durchzuführen, um das Präparat nicht unnötig der Strahlenbelastung durch die energiereichere UV-Strahlung auszusetzen und um bequemer arbeiten zu können. Da die in der UV-Mikroskopie interessierenden Präparate im sichtbaren Spektralbereich typische Phasenobjekte enthalten, die im Hellfeld mangels absorbierender Strukturen nahezu unsichtbar bleiben, wird zur Kontrastbildung das Dunkelfeld- und das Phasenkontrastverfahren angewendet. Bei Verwendung eines Spiegelkondensors kann dessen Zentralabschattung zur Erzeugung von Dunkelfeld in Verbindung mit solchen Mikroskopobjektiven genutzt werden, deren numerische Apertur kleiner ist als die innere Apertur des Kondensors. Das Phasenkontrastverfahren ist in der UV-Mikroskopie dann optimal gelöst, wenn keine speziellen Phasenkontrastobjektive mit eingebauten Phasenringen erforderlich sind, sondern normale UV-Objektive verwendet werden können, damit die Nachteile vermieden werden, die mit einem Objektivwechsel beim Übergang von der Phasenkontrastbeobachtung zur UV-Beobachtung bzw. UV-Fotometrie verbunden sind, z. B. das Auswandern eingestellter Präparatdetails aus einer definierten Bildmitte (= Meßblendenmitte) und aus dem (visuellen) Schärfenbereich. Darüber hinaus ist es vorteilhaft, wenn auch im UV-Beleuchtungsstrahlengang keine Manipulation für das Phasenkontrastverfahren erforderlich wird, wie Ein- und Ausschalten von Ringblenden, so daß ein normaler UV-Kondensor verwendet werden kann.

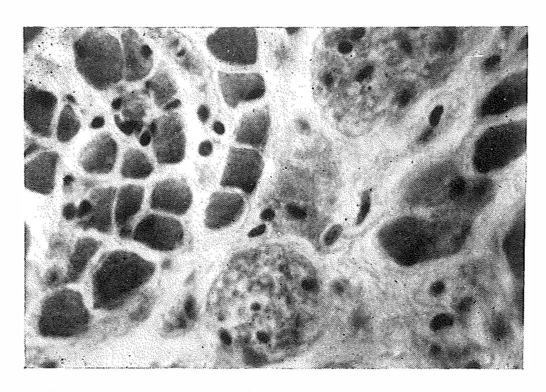
Der Strahlengang für ein Phasenkontrastverfahren in der UV-Mikroskopie, dessen Ringblenden P und Phasenringe P''' außerhalb des UV-Strahlengangs in einem VIS-Strahlengang angeordnet sind, so daß normale UV-Kondensoren und normale UV-Objektive verwendet werden können, wird in dem Optikschema Bild 6.116 gezeigt. P' und P'' sind Zwischenbilder der Ringblende in der Eintrittspupille des Kondensors und in der Austrittspupille des Objektivs. Die Beobachtung der Pupille und damit die Zentrierung von Ringblende und Phasenring sind bei eingeschobener Bertrand-Linse möglich.

Die Fluoreszenzbildwandlung und das Phasenkontrastverfahren nach dem Optikschema (Bild 6.116) wurden durch das UV-Mikroskop des VEB Carl Zeiss JENA [334] [336] realisiert.

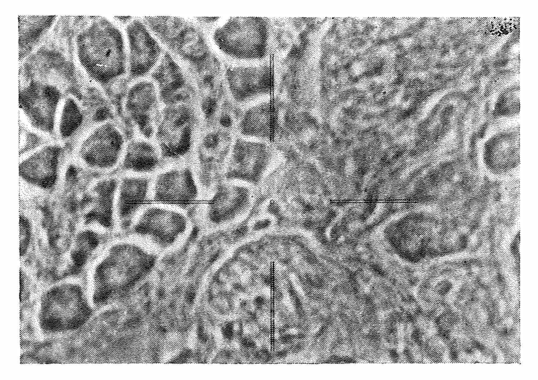
Das vom Objektiv erzeugte Zwischenbild O'_M dient zur objektiven Verwertung des UV-Bilds, z. B. zur UV-Fotografie oder UV-Fotometrie. Im Fall der Fotografie erfolgt eine Nachvergrößerung im Maßstab 6,3:1 durch ein in der Kamera eingebautes Spiegelprojektiv. Neben fotografischer Fotometrie sind lichtelektrische Fotometrie und Fluoreszenzfotometrie möglich.

Weitere UV-Mikroskope werden im Abschnitt 6.1.7. beschrieben.

Viele biologische Objekte sind ohne Anfärbung im Hellfeld praktisch unsichtbar, weil die wichtigsten Stoffe biologischer Objekte, die Nukleinsäuren und Proteine, im sichtbaren Spektrum nicht oder nur unbedeutend absorbieren. Durch das Phasenkontrastverfahren entsteht von einem solchen ungefärbten Präparat ein Bild mit unterschiedlichem Hell-Dunkel-Kontrast, der auf unterschiedliche Gangunterschiede oder – bei gleicher Dicke – auf unterschiedliche Brechzahlen der vorhandenen Objektstrukturen zurückzuführen ist. Im ultravioletten Licht geeigneter Wellenlänge erhält man von demselben ungefärbten Präparat ein Absorptionsbild, bei dem die im Präparat enthaltenen Objektstrukturen durch selektive Absorption der sie aufbauenden Stoffe in Erscheinung treten. Dies führt dazu, daß der Bildcharakter des UV-Absorptionsbilds von dem des Phasenkontrastbilds recht verschieden sein



a) UV-Aufnahme bei 263 nm,
Abb.-Maßstab des Negativs 400 : 1;



b) Phasenkontrastbild mit Strichmarkierung, wie es im VIS-Einblick erscheint.

Bild 6.117. Zungenmuskulatur der Maus

Glyzerineinbettung, aufgenommen mit Spiegelobjektiv 63/0,65 (s. Tafel 2.12)
und UV-Mikroskop des VEB Carl Zeiss JENA
Der unterschiedliche Informationsgehalt ist bei diesem Präparat auffallend

kann, wenn auch öfters einander entsprechende Strukturen im Kontrast Analogien zeigen (Bilder 6.117a und b). Der Unterschied der spektralen Abhängigkeit der Absorption von Objektdetails wird zu deren Substanzidentifikation verwendet (qualitative Mikrospektralanalyse). Bei bekannter Substanz führt die Ausmessung des Absorptionsbilds bzw. von abgegrenzten Strukturen des Bilds (z. B. von Zellkernen) zur Mengenbestimmung der Substanz (Mikrofotometrie). Die Ausmessung von Phasenkontrastbildern kann zum Bestimmen der Trockenmasse benutzt werden, die stoffunspezifisch ist.
Obwohl die selektive Absorption wichtiger Stoffe für die UV-Mikroskopie von vorrangiger Bedeutung ist, soll nicht unerwähnt bleiben, daß die ursprüngliche Absicht von *Köhler* [296] [297] bei der Einführung der UV-Mikroskopie darin bestand, durch die kleinere Wellenlänge im UV eine höhere Auflösung zu erreichen. Das Auflösungsvermögen steigt auf das Doppelte, wenn man von 550 (grünes Licht) zu 275 nm übergeht; oder: Der Durchmesser des zentralen Beugungsscheibchens schrumpft auf die Hälfte zusammen (s. Abschn. 2.4.1.1.). Der Bereich der förderlichen Vergrößerung müßte hiernach auf das 1000- bis 2000fache der numerischen Apertur festgelegt werden; doch kann man mit der Vergrößerung selbstverständlich auch unterhalb dieses Bereichs bleiben. Hin und wieder kann die gesteigerte Auflösung eine Rolle spielen.

6.1.6.3. Infrarotmikroskopie

Während für die UV-Mikroskopie vor allem die Gebiete interessant sind, die im sichtbaren Spektralbereich praktisch völlig durchlässig sind und deshalb erst durch selektive Absorption im ultravioletten Licht in ihrer Struktur in Erscheinung treten, hat es die Infrarotmikroskopie vor allem mit solchen Objekten zu tun, die im sichtbaren Spektralbereich nahezu völlig undurchlässig sind und bei denen es die Infrarotstrahlung infolge des größeren „Durchdringungsvermögens" erlaubt, Struktureinzelheiten darzustellen. Für Infrarotstrahlung sind bis zu einem gewissen Grad kalkhaltige Stoffe, das Chitin der Insekten und gewisse Pigmente, wie Melanin durchlässig.
Das Wellenlängengebiet bekannter Infrarotmikroskope, die zur Abbildung strukturierter Objekte dienen, wird durch die spektrale Empfindlichkeit der Bildempfänger begrenzt. Fotografische Schichten werden durch besondere Sensibilisatoren für das nahe Infrarot bis etwa 1,3 μm empfindlich. Die spektrale Empfindlichkeit von Infrarotfotokatoden elektronischer Bildwandler reicht ebenfalls nur bis etwa 1,3 μm. Ihre Wirkungsweise ist die gleiche, wie sie im Abschnitt 6.1.6.2. beschrieben wurde [276] [279] [284]. Ein Festkörperbildwandler, dessen Empfindlichkeit bei tiefen Temperaturen bis etwa 6 μm reicht, beruht auf der Kopplung eines Fotohalbleiters mit einer elektrolumineszierenden Schicht [277]. Bei Begrenzung auf das nahe Infrarot können für Infrarotmikroskope gewöhnliche Glühlampen als Strahlungsquellen verwendet werden. Durch ein Infrarotfilter wird das sichtbare Licht absorbiert und das infrarote durchgelassen. Als Objektive sind entweder normale Objektive oder Spiegelobjektive (s. Abschn. 2.5.3.) üblich.

Bei einem japanischen Infrarotmikroskop der Firma Nippon Electric Co. [324] wird ein mit Infrarotstrahlung beleuchtetes Objekt durch ein gewöhnliches Mikroskop vergrößert abgebildet und auf die Fotokatode eines mit 16 kV betriebenen elektronischen Bildwandlers fokussiert. Das auf dem Leuchtschirm des Bildwandlers entstehende sichtbare Bild kann direkt betrachtet oder mit einer Kamera auf einem gewöhnlichen Film fotografiert werden.

In der Infrarotspektralfotometrie werden gelegentlich mikroskopische Abbildungssysteme verwendet, um Mikroproben zu untersuchen [257] [258]. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um Untersuchungen an mikroskopisch strukturierten Objekten. Deshalb werden solche Einrichtungen im engeren Sinne nicht als Infrarotmikroskope bezeichnet.

Eine besondere Art von Infrarotmikroskopen [295] [299] [300], die die Emission infraroter Strahlung zur Temperaturmessung kleiner Bereiche nutzen, werden auch als Mikropyrometer bezeichnet. Ihre Hauptanwendung ist die Bestimmung von Temperaturprofilen von mikroelektronischen Schaltkreisen [281] [286] [308] [328] [348] [356] [361], wobei es darauf ankommt, unzulässige Erwärmungen festzustellen, die entweder Änderungen in der Schaltungstopologie erfordern oder in der routinemäßigen Fertigungsüberwachung auf Fertigungsmängel aufmerksam machen. Ferner sind Temperaturmessungen an Chemiefasern und ähnlichen Objekten von mikroskopisch kleinen Dimensionen möglich. Die Objekte sind im Sinne der mikroskopischen Abbildung Selbstleuchter.

Die optische Auflösung liegt bei dem in Frage kommenden Temperaturbereich zwischen 30 und 300 °C in der Größenordnung von 10 μm und die thermische Auflösung, d.h. die kleinste noch meßbare Temperaturdifferenz, in der Größenordnung von Zehntelgrad.

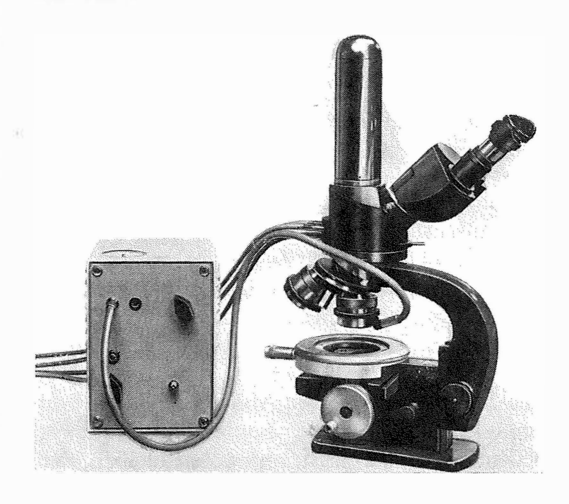
Für IR-Strahlung von $\lambda = 10\ \mu$m, die dem Energiemaximum bei 30 °C entspricht, beträgt nach der Gl. (2.54) im Abschn. 2.4.1.1. der kleinste noch auflösbare Abstand bzw. der Durchmesser des zentralen Beugungsscheibchens in der Objektebene 13 μm bei einer numerischen Apertur $A = 0{,}45$ und 9 μm bei $A = 0{,}65$ (numerische Aperturen der Spiegelobjektive vom katoptrischen Typ nach Tafel 2.13, S. 85). Die kleinste meßtechnisch verwertbare Objektgröße ist aufgrund der Beugungsstruktur bei der Abbildung etwas größer als der kleinste auflösbare Abstand anzunehmen.

Die zu messenden Objektstellen werden im Mikroskop vergrößert auf einen geeigneten Strahlungsempfänger abgebildet, dessen Größe entsprechend der Meßfläche des Objekts und des Abbildungsmaßstabs des Mikroskops zu wählen ist. Es werden vornehmlich thermische Strahlungsempfänger, wie Vakuumthermoelemente oder Bolometer, verwendet. Strahlungsempfänger auf fotoelektrischer Grundlage vom Typ InSb erfordern in den interessierenden Wellenlängenbereichen eine Kühlung, z.B. mit flüssigem Stickstoff, und sind deshalb wesentlich aufwendiger.

Von der DAW-Forschungsstelle für Meßtechnik und Automatisierung (FMA) wurde ein Mikropyrometer (Bild 6.118) unter Verwendung von Baueinheiten des VEB Carl Zeiss JENA entwickelt [300]. Das auf einem mit Feinmeßschrauben verstellbaren Kreuztisch angeordnete Objekt wird wahlweise mit dem Spiegelobjektiv 20/0,45 oder 40/0,65 auf die Empfängerfläche eines Vakuumthermoelements oder Bolometers [299] abgebildet. Das Eintrittsfenster des Strahlungsempfängers besteht aus Kaliumbromid (KBr) und ist entweder planparallel oder als Linse mit zweifacher Verkleinerung (Abbildungsmaßstab $M_L = 0{,}5$) ausgebildet. Mit den Spiegelobjektiven und der KBr-Linse ergibt sich im Meßstrahlengang der Abbildungsmaßstab 10:1 bzw. 20:1. Die Breite der Empfängerfläche kann für Vakuumthermoelemente (VTh) zwischen 0,3 und 3 mm und für Bolometer zwischen 0,15 und 4 mm variieren. Im visuellen Einblick des Mikropyrometers

Bild 6.118. Mikropyrometer MP 2

Institut für Meßtechnik und Automatisierung DAW, Institutsfoto



ist das thermisch ausmeßbare Feld markiert. Es dient zum Aufsuchen und Einstellen der Objektstelle. Die Beleuchtung der Meßobjekte erfolgt über Lichtleitkabel im Auflicht. Die vom Objekt emittierte Infrarotstrahlung wird durch einen Chopper, der zwischen Objektiv und Strahlungsempfänger angeordnet ist, in Wechsellicht verwandelt, das verstärkungstechnisch zur Meßanzeige benutzt wird. Als Registriergerät eignet sich der Kompensationsschreiber des VEB Carl Zeiss JENA, der überdies eine Kopplung zwischen Tischvorschub und Antriebsrolle des Schreibers ermöglicht.

6.1.6.4. Röntgenmikroskopie

Unter Röntgenmikroskopie versteht man die Untersuchung mikroskopischer Objekte mit Röntgenstrahlen. Das Ziel besteht einerseits darin, das Auflösungsvermögen gegenüber dem Lichtmikroskop aufgrund der kleineren Wellenlänge zu steigern, und andererseits, das gänzlich andere Absorptionsverhalten der Substanzen bei Durchstrahlung mit Röntgenstrahlen auszunutzen.

Wie bereits erwähnt, sind die selektiven Absorptionen im Röntgengebiet elementspezifisch und erlauben im Prinzip den Nachweis bestimmter Elemente im mikroskopischen Präparat. Die Schwächung der Röntgenstrahlen beim Durchgang durch einen Stoff genügt dem Lambertschen Gesetz

$$\Phi = \Phi_0 \, e^{-Kd},$$

wie es im optischen Bereich (VIS, UV, IR) gilt (s. Abschn. 6.1.7.2.). Die Intensität der einfallenden Röntgenstrahlung ist Φ_0, die Intensität der austretenden Φ nach Durchgang durch einen Stoff der Dicke d. Als den Schwächungskoeffizienten K bezeichnet man den, der sich additiv aus dem Absorptionskoeffizienten μ und dem Streukoeffizienten σ zusammensetzt. Die selektiven Absorptionen der Elemente sind durch den Absorptionskoeffizienten bestimmt, während der Streukoeffizient unspezifisch ist und besonders bei längeren Wellenlängen vernachlässigt werden kann.

Die durch den Absorptionskoeffizienten bestimmte Schwächung der Röntgenstrahlung hat ihre Ursache in der fotoelektrischen Absorption (Fotoabsorption), d.h., die Strahlungsenergie wird zum Loslösen von Elektronen aus dem Atomverband benutzt. Die elementspezifische Absorption beruht darauf, daß die Absorption sprunghaft ansteigt, wenn die Energie der Röntgenstrahlungsquanten ($E = h\nu = hc/\lambda$) gleich oder größer wird als die Bindungsenergie von Elektronen in der K-Schale, den L-Schalen, M-Schalen usw. der betreffenden Elemente und somit ausreicht, um diese Elektronen aus dem Atomverband zu entfernen [256] [306] [318].

Diese wellenlängenabhängigen selektiven Absorptionsstellen heißen Absorptionskanten. Sowohl auf der kurzwelligen als auch auf der langwelligen Seite der Absorptionskante gilt für den Absorptionskoeffizienten die Näherungsgleichung

$$\mu = CZ^4\lambda^3,$$

wobei die Konstante C auf beiden Seiten der Absorptionskante verschiedene Werte hat. Diese Gleichung besagt, daß die Absorption sowohl mit größer werdender Wellenlänge λ als auch mit zunehmender Ordnungszahl Z der Elemente rasch zunimmt. Bei biologisch-medizinischen Anwendungen handelt es sich meist um Stoffe, die aus Elementen niedriger Ordnungszahl bestehen. Damit mikroskopische Präparate von geringer Dicke (einige Mikrometer) noch genügend stark absorbieren, müssen die Röntgenwellenlängen verhältnismäßig groß sein, wenn keine speziellen Kontrastmittel verwendet werden sollen. Die K-Absorptionskanten wichtiger Zellbestandteile (Sauerstoff bei 2,3 nm, Stickstoff bei 3,1 nm, Kohlenstoff bei 4,4 nm) ergeben günstigen Kontrast oder aufschlußreiche Kontrastunterschiede erst bei Wellenlängen von der Größenordnung 1,0 nm.

Knochengewebe kann bei kleinerer Wellenlänge kontrastreich abgebildet werden.

Die Untersuchung mikroskopischer Präparate durch Röntgenstrahlung erfolgt mit unterschiedlichen Methoden. Man unterscheidet die Mikroradiografie (Kontakt-Mikroradiografie), die Röntgenschattenmikroskopie (Projektions-Röntgenmikroskopie), die Röntgenmikroskopie durch Kristallreflexion und die Röntgenmikroskopie auf der Grundlage der Totalreflexion, die die einzige Methode ist, die im Sinne der Lichtmikroskopie mit optischen Systemen eine Fokussierung der Röntgenstrahlen ermöglicht. Wir können hier nur auf die letztgenannte Methode eingehen, während die vorher genannten nur kurz angedeutet werden. Im übrigen wird auf die einschlägige Literatur verwiesen.

Bei der Mikroradiografie handelt es sich nicht im eigentlichen Sinne um Mikroskopie mit Röntgenstrahlen. Vielmehr werden das Objekt und der zur Aufzeichnung dienende Film miteinander in Kontakt gebracht (Kontakt-Mikroradiografie)

und durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlung ein Röntgenfoto hergestellt, das nachträglich mit einem Mikroskop betrachtet wird.
Ein einfaches kommerzielles Gerät für Kontakt-Mikroradiografie wurde von *Philips* entwickelt [264]. Die Röntgenstrahlung tritt aus dem Vakuum der Röntgenröhre durch ein Berylliumfenster von 50 μm Dicke aus. Beryllium hat infolge der geringen Ordnungszahl 4 nur eine geringe Absorption. Die Auflösung des Geräts hängt vornehmlich von der Auflösung des verwendeten Films ab und wird mit 0,5 bis 1 μm angegeben.
Bei Anwendung der Mikroradiografie auf die Histologie spricht man auch von Historadiografie [271]. Es sei erwähnt, daß die Autoradiografie eine ähnliche Methode darstellt. Sie unterscheidet sich jedoch dadurch von der Mikroradiografie, daß das Objekt mit radioaktiven Substanzen markiert wird, deren radioaktive Strahlung die Schwärzung auf dem Film erzeugt, der mit dem Objekt in Kontakt gebracht wird.
Bei der Röntgenschattenmikroskopie (Projektions-Röntgenmikroskopie) wird von einem mikroskopischen Objekt auf einen Projektionsschirm ein vergrößertes Bild projiziert. Wichtig für die Schattenprojektion ist die Existenz einer nahezu punktförmigen Röntgenstrahlungsquelle, um eine gute Auflösung zu erhalten. Die punktförmige Röntgenstrahlungsquelle von der Größenordnung 0,1 μm wird durch Fokussierung von Elektronenstrahlen nach Art eines umgekehrten Elektronenmikroskops erzeugt.
Man nennt diese Methode mitunter auch Projektions-Mikroradiografie [325].
Eine fokussierende Wirkung von Röntgenstrahlen kann durch gebogene Kristallreflektoren erzielt werden.
Die Reflexion erfolgt an den Netzebenen der Kristalle durch die sog. Braggsche Reflexion [254] [288].
Die Versuche, Röntgenstrahlen wie Lichtstrahlen durch Brechung und Spiegelung durch Linsen und Spiegel zu fokussieren, blieben lange Zeit erfolglos und führten zu der Ansicht, daß die Benutzung der Röntgenstrahlen zu Abbildungszwecken unmöglich sei. Daß man mit konventionellen optischen Bauelementen keinen Erfolg hatte, beruht darauf, daß sich die Brechzahl der festen Körper für Röntgenstrahlen üblicher Wellenlängen von 1 nur um einen kleinen Betrag δ von der Größenordnung 10^{-5} unterscheidet, und zwar ist die Brechzahl < 1 ($n = 1 - \delta$ mit $\delta > 0$) [319] [320]. Die Brennweite einer bikonkaven Linse mit gleichen Radien wird im Gebiet der Röntgenwellenlängen

$$\frac{1}{f'} = (n-1)\frac{2}{r} = -\delta\frac{2}{r}$$

oder

$$f' = \frac{|r|}{2\delta} \approx \frac{|r|}{2}\,10^5 .$$

Für $|r| = 10$ mm erhält man eine Brennweite von 500 m. Es ist somit völlig aussichtslos, die Brechung zur Abbildung durch Röntgenstrahlen zu benutzen. Außerdem kommt beim Durchgang durch Materie die Absorption hinzu, die bei langwelliger Röntgenstrahlung erheblich ist. Hingegen läßt sich mit Spiegelungen eine Fokussierung der Röntgenstrahlen erreichen, und zwar unter Ausnutzung der Totalreflexion. Da wegen $n < 1$ im Gebiet der Röntgenwellenlängen die Materie optisch dünner als Vakuum (oder Luft) ist, tritt Totalreflexion auf, wenn Röntgenstrahlung, aus dem Vakuum kommend, auf Materie unter einem Winkel auftrifft, der größer als der Grenzwinkel der Totalreflexion ist. Da sich die Brechzahl von 1 nur wenig unterscheidet, ist der Grenzwinkel der Totalreflexion von 90° nur wenig verschieden. Erst bei Wellenlängen in der Größenordnung von 1,0 nm erreicht sein Komplementwinkel, den wir als Glanzwinkel bezeichnen und der in erster Näherung proportional der Wellenlänge ist, einige Grade. Für diese sehr weiche Röntgenstrahlung ist die Absorption bereits erheblich, so daß der scharfe Übergang zwischen vollkommener Reflexion und sehr geringer Reflexion am Grenzwinkel der Totalreflexion, wie er bei Medien mit vernachlässigbar kleiner Absorption auftritt, nicht mehr vorhanden ist. Der Übergang von nahezu vollkommen reflektierter Strahlungsenergie bei fast streifender Reflexion zu praktisch verschwindender reflektierter Energie bei größeren Glanzwinkeln erfolgt mehr oder weniger allmählich [285] [338]. Bei Glanzwinkeln, die in diesem Übergangsgebiet liegen, spricht man von Totalreflexion der Röntgenstrahlen.
Läßt man von einem Objekt ein Strahlenbündel fast streifend auf einen flach gewölbten Spiegel auftreffen, so entsteht durch Reflexion ein stark astigmatisches (linienhaftes) Bild. Durch aufeinanderfolgende Anordnung gekreuzter Hohlspiegel bzw. zylindrischer Spiegel wurde von *Kirkpatrick* und *Baez* [294] eine geeignete Optik für vergrößernde Abbildung durch Röntgenstrahlen auf der Grundlage der Totalreflexion

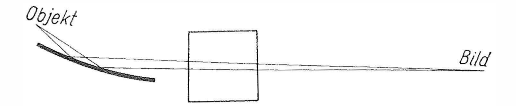


Bild 6.119. Schematische Darstellung der Spiegelanordnung des Röntgenmikroskops nach Kirkpatrick und Baez

In der Zeichenebene verläuft ein Strahlenbüschel, das bezüglich des ersten Zylinderspiegels als Meridionalbüschel zu bezeichnen ist. Das dazu rechtwinklig verlaufende (nicht dargestellte) Büschel ist für den zweiten Spiegel das Meridionalbüschel und wird von diesem fokussiert

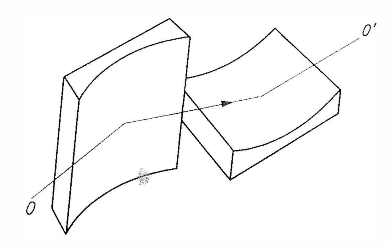


Bild 6.120. Perspektivische Darstellung der Spiegelanordnung nach Kirkpatrick und Baez

Es ist der Verlauf der optischen Achse (bzw. des Hauptstrahls) eingezeichnet

angegeben (Bilder 6.119 und 6.120). Der Hauptgedanke der optischen Anordnung besteht darin, daß das von einem Objektpunkt ausgehende räumliche Strahlenbündel so fokussiert wird, daß der erste Spiegel das Meridionalbündel fokussiert und das Sagittalbündel praktisch unfokussiert läßt, während der rechtwinklig dazu angeordnete zweite Hohlspiegel das bisher unfokussierte Bündel fokussiert und das bereits fokussierte nahezu unbeeinflußt läßt. Dieses optische System für Röntgenmikroskopie wurde hinsichtlich Auflösungsvermögens [332] und optischer Bildfehler [268] näher untersucht. Verbesserungen sind durch Verwendung von vier Spiegeln möglich, die, wie im Bild 6.120 dargestellt, abwechselnd rechtwinklig zueinander angeordnet sind [294]. Experimentelle Untersuchungen führten zu Auflösungsgrenzen in der Größenordnung von 1 μm [287] [307], während die theoretische Auflösungsgrenze geringer ist.

Eine andere Lösung des Problems der Fokussierung von Röntgenstrahlen mittels Totalreflexion gab *Montel* [315] [316] an, der ebenfalls rechtwinklig aufeinanderstehende Kugelspiegel verwendet, die jedoch nicht nacheinander angeordnet sind, sondern etwa längs eines Durchmessers in einer Kante zusammenstoßen. Er bezeichnet dieses optische System als katamegonisch.

Die ersten rotationssymmetrischen Spiegelsysteme, die eine Abbildung mit kleinen Glanzwinkeln gestatten, wurden von *Wolter* [371] angegeben. Es handelt sich hierbei um sehr schlanke rotationssymmetrische Hohlkörper, deren Erzeugende Kurven 2. Ordnung sind, so daß die Abbildung ohne Öffnungsfehler und mit annähernd erfüllter Sinusbedingung erfolgt (Bild 6.121). Diese Spiegelsysteme haben eine sehr große Zentralabschattung, was bekanntlich nachteilig ist. Von *Riesenberg* [335] wurden zentralabschattungsfreie, rotationssymmetrische Spiegelsysteme angegeben, die ebenfalls die Abbildung bei kleinen Glanzwinkeln gestatten (Bild 6.122). Sie enthalten zwei zentral angeordnete kegelförmige Spiegel (K-Spiegel), deren Erzeugende Kurven 2. Ordnung sind und die fokussierende Wirkung ergeben, während die schwieriger herzustellenden Hohlkörper als Hohlkegelspiegel ausgeführt sind. Spiegelsystemen dieser Art kann aufgrund der fehlenden Zentralabschattung und der Möglichkeit, sie mit größeren Aperturen herzustellen, auch außerhalb des Gebiets der Röntgenmikroskopie Bedeutung zukommen.

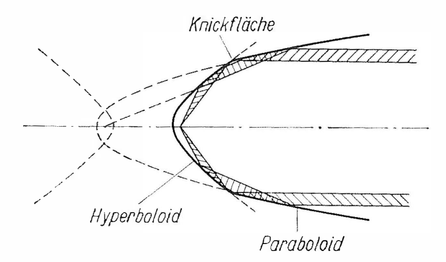


Bild 6.121. Schematische Darstellung eines Spiegelsystems nach Wolter

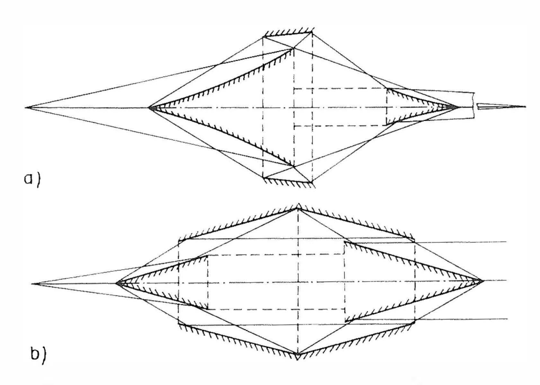


Bild 6.122. K-Spiegelsysteme nach Riesenberg

a) Dreispiegelsystem,
im Beispiel mit Abbildungsmaßstab 5 :1;
b) Vierspiegelsystem,
im Beispiel mit unendlicher Bildweite

Daß die Röntgenmikroskopie auf der Grundlage der Totalreflexion bis jetzt keine größere praktische Bedeutung erlangt hat, beruht darauf, daß sehr hohe Anforderungen an die Ausführung der Spiegel hinsichtlich Gestalt und Oberfläche gestellt werden müssen.

6.1.7. Mikrofotometrie und Mikrospektralfotometrie

von Dr. rer. nat. *Horst Riesenberg*

6.1.7.1. Allgemeines

Bei den beiden Verfahren der Mikrofotometrie bzw. Mikroskopfotometrie und der Mikrospektralfotometrie interessiert man sich für fotometrische Messungen an mikroskopischen Objekten mit dem Mikroskop. Im Vordergrund des Interesses stehen Messungen der Durchlässigkeit bzw. der Extinktion gefärbter oder ungefärbter Präparate mit dem Ziel der Substanzidentifikation und der Bestimmung des Substanzgehalts. Will man die Anwendung der mikrofotometrischen Verfahren auf spezielle mikroskopische Objekte hervorheben – z.B. auf biologische Zellen oder Gewebeschnitte –, so spricht man von Zytofotometrie oder Histofotometrie. Ein weiterer Unterschied bezieht sich auf den Spektralbereich, in dem die mikrofotometrischen Messungen erfolgen. Für die UV-Mikrofotometrie und UV-Mikrospektralfotometrie können die Präparate im natürlichen (bzw. fixierten) ungefärbten Zustand vorliegen. Die Mikrofotometrie im Sichtbaren erfordert bei biologischen Objekten nahezu immer eine Färbung der Präparate, wobei die anzuwendenden Färbemethoden stoffspezifisch und stöchiometrisch sein sollen, damit der gemessene Farbstoffgehalt dem zugeordneten Substanzgehalt entspricht. Durch die Entwicklung der Mikroelektronik haben sich Aufgaben ergeben, die die Messung von Schwärzungsverteilungen an Objekten mit mikroskopischen Dimensionen erfordern [283]. Die Mikrofotometrie kann von der Mikrospektralfotometrie wie folgt unterschieden werden: Bei der Mikrospektralfotometrie interessiert vorrangig die fotometrische Messung der Durchlässigkeit bzw. der Extinktion einer bestimmten Objekteinzelheit in Abhängigkeit von der Wellenlänge mit dem Ziel, durch das Absorptionsspektrum auf die stoffliche Natur des Objektdetails zu schließen (qualitative Mikrospektralanalyse). Bei der Mikrofotometrie liegt der Hauptschwerpunkt auf der fotometrischen Messung der Extinktion von Objekteinzelheiten eines mikroskopischen Präparats bei konstanter Wellenlänge, häufig mit dem Ziel der Bestimmung einer Substanzmenge. Die Bestimmung der Menge einer bestimmten Substanz, deren Existenz man im Objekt bereits kennt, kann auch als Aufgabe der quantitativen Mikrospektralanalyse aufgefaßt werden. Da bei Untersuchungen an Zellen oder Zellbestandteilen die Substanzen meist bekannt sind, kommen die mikrofotometrischen Verfahren bei festen Wellenlängen weitaus häufiger zum Einsatz.

6.1.7.2. Physikalische und meßtechnische Grundlagen

Messung der Strahlungsabsorption, Reintransmissionsgrad und Extinktion

Die Mikrofotometrie und die Mikrospektralfotometrie sind ihrem Wesen nach Absorptionsfotometrie, deren Aufgabe darin besteht, absorbierende Substanzen zu messen und daraus qualitativ und quantitativ Rückschlüsse auf Art und Menge der Substanz zu ziehen. Bei stöchiometrisch angefärbten Präparaten wird der absorbierende Farbstoffgehalt gemessen und damit indirekt auf die Stoffmenge geschlossen, an die der Farbstoff sich spezifisch angelagert hat oder mit der er eine spezifische Farbreaktion eingegangen ist.

In der Mikrofotometrie wird der Strahlungsfluß durch das absorbierende Objektdetail und eine benachbarte nichtabsorbierende Objektstelle (Leerstelle) gemessen. In einigen größeren Geräten für die Mikrospektralfotometrie mit einer Auftrennung der Strahlengänge in Meß- und Vergleichsstrahlengang wird in Analogie zur Makrofotometrie im Vergleichsstrahlengang ein dem zu messenden mikroskopischen Präparat angepaßtes Vergleichspräparat angeordnet.

Im Bild 6.123 ist schematisch eine durch Schraffur gekennzeichnete absorbierende Substanz in

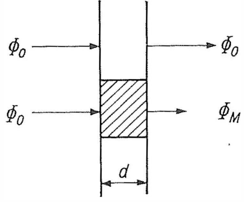


Bild 6.123. Durchgang von Strahlung durch ein absorbierendes Objektdetail und durch eine absorptionsfreie Leerstelle

einem nichtabsorbierenden Umfeld von gleicher Dicke d dargestellt. Φ_0 ist der Strahlungsfluß der eintretenden Strahlung und Φ_M der Strahlungsfluß der aus dem zu messenden Medium austretenden Strahlung. Der Quotient dieser beiden Größen heißt Reintransmissionsgrad ϑ.

$$\vartheta = \frac{\Phi_M}{\Phi_0}. \tag{6.20}$$

Meßtechnisch wird er aus den Messungen des Strahlungsflusses Φ_M nach Durchgang durch die absorbierende Substanz und des Strahlungsflusses Φ_0 nach Durchgang durch die benachbarte Leerstelle durch Quotientenbildung ermittelt.
Der Reinabsorptionsgrad α ist definiert durch

$$\alpha = 1 - \vartheta = 1 - \frac{\Phi_M}{\Phi_0} = \frac{\Phi_0 - \Phi_M}{\Phi_0}. \tag{6.21}$$

Die beiden Größen ϑ und α beziehen sich auf die Schwächung des Strahlungsflusses allein durch die Absorption.
Wird beim Durchgang von Strahlung durch das zu messende Objekt zusätzlich ein Strahlungsanteil gestreut, so kann dies zu Meßfehlern führen, weil eine zu große Absorption vorgetäuscht wird. Eine Methode, den Streulichtfehler zu berücksichtigen, wird auf S. 252 angegeben.
Die zahlenmäßige Angabe von ϑ und α ist nur sinnvoll, wenn gleichzeitig die Wellenlänge λ mit angegeben wird, bei der die Messung erfolgte, weil Transmission bzw. Absorption von der Wellenlänge abhängen. Es ist deshalb besser, die beiden Größen mit dem Index λ zu kennzeichnen: ϑ_λ und α_λ. Die in der Fotometrie wichtigste physikalische Größe ist die Extinktion E, die mit dem Reintransmissionsgrad ϑ in der Beziehung

$$E = \lg \frac{1}{\vartheta} \tag{6.22}$$

steht. Die Extinktion ist der dekadische Logarithmus des reziproken Werts des Reintransmissionsgrads. Soll die Wellenlängenabhängigkeit der Extinktion hervorgehoben werden, ist es zweckmäßig, sie mit dem Index λ als E_λ zu kennzeichnen. Eine zahlenmäßige Zuordnung für einige Werte der Extinktion und des Reintransmissionsgrads ist in Tafel 6.6 angegeben. Dabei ist der Reintransmissionsgrad in Prozent ausgedrückt (ϑ in $\% = 100\vartheta$).
Die zur Ermittlung von ϑ bzw. E erforderlichen Messungen der Strahlungsflüsse Φ_0 und Φ_M erfolgen entweder lichtelektrisch oder durch fotografische Fotometrie. Bei der lichtelektrischen Meßmethode dient als Strahlungsempfänger eine Fotozelle oder ein Fotovervielfacher, bei denen die einfallende Strahlungsenergie in elektrischen Strom umgewandelt wird. Dieser Fotostrom i ist dem einfallenden Strahlungsfluß Φ weitgehend proportional ($i = c\Phi$; c Konstante). Für die praktische Durchführung der Messungen ist es zweckmäßig, das Meßgerät so einzustellen, daß bei der Messung der Leerstelle Vollausschlag mit 100 Skalenteilen erreicht wird, so daß bei der Messung der absorbierenden Stelle der Reintransmissionsgrad direkt in Prozent abgelesen werden kann. Hat das Meßgerät eine Extinktionsskale, so soll der Leerstelle zweckmäßig die Extinktion Null entsprechen. Für die absorbierende Stelle kann man dann den zugehörigen Extinktionswert direkt ablesen. – Bei der fotografischen Fotometrie dient eine fotografische Platte als Strahlungsempfänger, auf der das mikroskopische Präparat abgebildet wird. Über die Schwärzungen, die von der interessierenden Präparatstelle und vom Umfeld sowie von einem Bezugssystem (Platinstufenfilter oder rotierender Sektor) auf der fotografischen Platte erzeugt werden, können ϑ bzw. E ermittelt werden (s. Abschn. 6.1.7.3.).

Lambert-Beersches Gesetz

Die Bedeutung der Extinktion als physikalische Größe und als Meßgröße für die Strahlungsabsorption resultiert daraus, daß die Extinktion direkt proportional der Schichtdicke einer ab-

Tafel 6.6. Übersicht über Extinktionswerte und Reintransmissionsgrade

$\vartheta\%$	100	50	20	10	5	2	1	0,5	0,1
E	0	0,301	0,699	1,000	1,301	1,699	2,000	2,301	3,000

E	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
$\vartheta\%$	100	79,4	63,1	50,1	39,8	31,6	25,1	20,0	15,9	12,6	10,0

sorbierenden Substanz ist, wenn die Substanz im Meßbereich homogen oder statistisch gleich verteilt ist. Dieser einfache mathematische Zusammenhang trifft für den Reintransmissionsgrad nicht zu. Der Reintransmissionsgrad nimmt mit der Schichtdicke exponentiell ab. Beide Aussagen sind Inhalt eines Absorptionsgesetzes, das als Lambertsches Gesetz bezeichnet wird und in der Gestalt der linearen Abhängigkeit der Extinktion von der Schichtdicke seinen wichtigsten Ausdruck findet:

$$E = md. \tag{6.23}$$

m oder genauer m_λ ist eine die Absorption kennzeichnende wellenlängenabhängige Konstante mit der Einheit cm^{-1} und wird Extinktionsmodul genannt. Er gibt die Extinktion des Mediums für eine Schichtdicke von 1 cm bei der Wellenlänge λ an. Bei der Absorption von Lösungen ist die Extinktion – bei fester Schichtdicke d – häufig proportional der Konzentration des gelösten Stoffs. Das bedeutet, daß der Extinktionsmodul m linear von der Konzentration c des Stoffs abhängt:

$$m = \varepsilon c. \tag{6.24}$$

Dieser Zusammenhang ist das Beersche Gesetz; ε ist eine (wellenlängenabhängige) Stoffkonstante und wird Extinktionskoeffizient genannt.
Die aus den Gln. (6.23) und (6.24) kombinierte Form

$$E_\lambda = \varepsilon_\lambda cd \tag{6.25}$$

heißt Lambert-Beersches Gesetz und gilt als Grundlage der Absorptionsfotometrie. Hiernach ist die Extinktion der Konzentration der absorbierenden Substanz und der Schichtdicke proportional.
Wird die Konzentration in mol/l angegeben, so heißt ε_λ molarer dekadischer Extinktionskoeffizient und hat die Einheit cm^{-1} $(mol/l)^{-1}$. Bei unbekannter Molekularmasse gibt man die Konzentration in g/l an. Dann wird ε_λ spezieller Extinktionskoeffizient genannt und mit ε'_λ bezeichnet, falls eine Unterscheidung zur Vermeidung von Verwechslungen angebracht erscheint. Der spezielle Extinktionskoeffizient hat die Einheit cm^{-1} $(g/l)^{-1}$ oder cm^2 m g^{-1}.
In der exponentiellen Form ist das Lambert-Beersche Gesetz durch die Gleichung

$$\vartheta_\lambda = \left(\frac{\Phi}{\Phi_0}\right) = 10^{-\varepsilon_\lambda cd} \tag{6.25a}$$

gegeben.

Das Lambert-Beersche Gesetz gilt nur unter bestimmten Voraussetzungen, die nicht immer streng erfüllt sind.
Die empirische Feststellung des Geltungsbereichs des Beerschen Gesetzes durch Messung der Extinktion einer Substanz bei verschiedenen bekannten Konzentrationen und konstanter Schichtdicke, wobei sich beim Auftragen der Meßwerte eine Gerade entsprechend $m = \varepsilon c$ ergeben muß, läßt sich makroskopisch leicht durchführen, kann jedoch im mikroskopischen Objekt nicht realisiert werden. Liegt eine Konzentrationsabhängigkeit des Extinktionskoeffizienten $\varepsilon = \varepsilon(c)$ einer absorbierenden Substanz über einem weiten Bereich der Konzentration vor, der von sehr verdünnten Lösungen im Makrobereich bis zu hohen Konzentrationen im mikroskopischen Präparat reichen möge, so braucht dies noch kein Grund dafür zu sein, das Lambert-Beersche Gesetz nicht anwenden zu können. Denn die im mikroskopischen Präparat vorkommenden Konzentrationen können nur einen kleinen Bereich aus dem betrachteten Gesamtbereich der Konzentration ausmachen, so daß der Extinktionskoeffizient der absorbierenden Substanz im mikroskopischen Präparat als annähernd konstant angenommen werden kann, wenn er auch von dem abweicht, der im verdünnten Zustand der absorbierenden Substanz gilt. Bei der Mengenbestimmung einer absorbierenden Substanz, z.B. in einem Zellkern, braucht der Zahlenwert des Extinktionskoeffizienten überdies nicht bekannt zu sein, wenn es auf Relativmessungen ankommt, die bei biologischen und medizinischen Untersuchungen bei weitem überwiegen. Allerdings ist auch bei Relativmessungen die Konstanz des Extinktionskoeffizienten der zu vergleichenden absorbierenden Substanz zu fordern. Änderungen des Extinktionskoeffizienten einer absorbierenden Substanz, z.B. von DNS, durch Denaturierung, verschiedenen pH-Wert oder verschiedenen Polymerisationsgrad sind keine Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz. Dadurch hervorgerufene Änderungen der Absorptionskurven können zur Ermittlung dieser besonderen Faktoren verwendet werden.
Die Voraussetzung des Lambertschen Gesetzes, das die Proportionalität der Extinktion mit der Dicke der absorbierenden Substanz enthält, besteht in der homogenen Verteilung der Substanz. Bei der Mengenbestimmung braucht diese Voraussetzung nicht erfüllt zu sein, wie auf den folgenden Seiten gezeigt wird.
Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz hängt die

gemessene Extinktion von der von der Strahlung durchlaufenen Weglänge innerhalb der absorbierenden Substanz ab. Betrachtet man ein Objekt mit zwei planparallelen Begrenzungsflächen, wie im Bild 6.123, so ist die durchlaufene Weglänge gleich der Dicke d des Objekts, vorausgesetzt, daß das Objekt von einem parallelen Strahlenbündel in Richtung der optischen Achse (Pfeilrichtung) durchsetzt wird. Ein streng paralleles Strahlenbündel käme einer verschwindenden Beleuchtungsapertur gleich und ist nicht realisierbar. Eine endliche, wenn auch kleine Beleuchtungsapertur ist deshalb meßtechnisch immer erforderlich. Allerdings ist zu beachten, daß mit steigender Beleuchtungsapertur die mittlere Weglänge der Strahlung bei Objekten nach Art von Bild 6.123 zunimmt und somit eine zu hohe Extinktion gemessen wird. Durch Korrekturgleichungen kann dieser Fehler eliminiert werden. Bei kugelförmigen Objekten ist die Weglänge der Strahlung unabhängig von der Größe der Beleuchtungsapertur. Als praktische Regel gilt, bei zytofotometrischen Messungen die Kondensorapertur etwa 0,3 zu wählen, wobei eine Korrektur entfallen kann.

Eine weitere Voraussetzung für die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes ist die Monochromasie der Strahlung. Aus meßtechnischen Gründen ist es nicht möglich, streng monochromatisches Licht herzustellen. Die verwendete Strahlung hat immer eine gewisse spektrale Bandbreite. Ihr zulässiger Betrag richtet sich nach dem spektralen Absorptionsverlauf der absorbierenden Substanz.

Grundlegende Gleichungen zur Mengenbestimmung einer absorbierenden Substanz

Im biologischen Objekt interessiert in erster Linie die Gesamtmenge einer Substanz in einer biologischen Einheit, z.B. die Masse an DNS in einem Zellkern.

Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz erhält man über die Konzentration $c = M/V$ die Masse M der absorbierenden Substanz im Volumen V:

$$M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} \frac{E_\lambda V}{d}.$$

Falls das Volumen die Gestalt eines Quaders oder eines Zylinders mit A als Grundfläche und d als Höhe hat (Bild 6.124), erhält man mit $V = Ad$

$$M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} E_\lambda A. \tag{6.26}$$

Zur Bestimmung der Masse der absorbierenden Substanz braucht somit seine Schichtdicke nicht

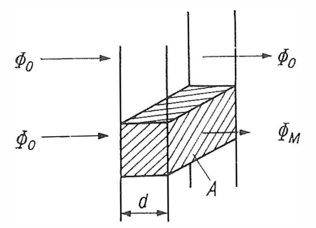


Bild 6.124. Zur fotometrischen Bestimmung der Menge einer absorbierenden Substanz, die in dem schraffierten Volumen $V = Ad$ enthalten ist. A ist die Größe des Meßfeldes, das z.B. auch kreisförmig sein kann. Aus den Strahlungsflüssen Φ_0 und Φ_M ergibt sich die Extinktion E nach den Gln. (6.20) und (6.22)

bekannt zu sein. Die Masse wird aus dem Produkt von Extinktion und Fläche der durchstrahlten Substanz berechnet.

Die Größe und Gestalt der Fläche A werden in der Mikrofotometrie durch die Meßblende bestimmt, die in einer der Dingebene konjugierten Bildebene angeordnet ist. Das ihr in der Dingebene entsprechende Meßblendenbild wird als Meßfeld bezeichnet.

Die Voraussetzungen für die Gültigkeit der Gl. (6.26) bestehen in der homogenen Verteilung der Substanz, die sich in einem quader- oder zylinderförmigen Raum zwischen planparallelen Flächen befindet. Beide Voraussetzungen treffen jedoch für mikroskopische Objekte im allgemeinen nicht zu. Soll z.B. der Substanzgehalt eines Zellkerns bestimmt werden, so hat man es mit einem mehr oder minder kugelförmigen Gebilde (Bild 6.125) zu tun, in dem die Konzentration ortsabhängig ist. Zur Bestimmung der Masse der absorbierenden Substanz in einem solchen Gebilde zerlegt man es in Volumenelemente ΔV, die

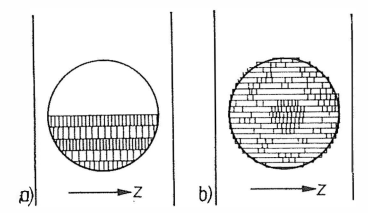


Bild 6.125. Zerlegung eines kugelförmigen Zellkerns in quaderförmige Volumenelemente (Schnittzeichnung). Die z-Richtung ist die Lichtrichtung.

a) Die absorbierende Substanz kann von Volumenelement zu Volumenelement in unterschiedlicher Konzentration vorliegen

b) Die Mengenbestimmung bleibt auch dann noch richtig, wenn die Konzentration sich in der Längsrichtung eines Volumenelements ändert

eine im Vergleich zur Fläche des Zellkerns kleine Meßfläche ΔA haben.
Das Volumenelement ΔV kann dann als quaderförmig betrachtet werden, und die im i-ten Volumenelement ΔV_i enthaltene Masse ΔM_i bestimmt sich entsprechend Gl. (6.26):

$$\Delta M_i = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} E_{\lambda,i} \Delta A_i. \tag{6.26a}$$

Die Gesamtmasse der absorbierenden Substanz erhält man durch Summierung aller Masseelemente ΔM_i, deren Anzahl n sei, zu

$$M = \sum_{i=1}^{n} \Delta M_i = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} \sum_{i=1}^{n} E_{\lambda,i} \Delta A_i. \tag{6.27a}$$

Sind die Meßflächen ΔA_i untereinander gleich ($\Delta A_i = \Delta A$) und überdecken sie die zu messende Zellkernfläche A lückenlos, so ergibt sich

$$M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} \Delta A \sum_{i=1}^{n} E_{\lambda,i}, \tag{6.27b}$$

wonach man die Masse der absorbierenden Substanz aus der Summe der Einzelextinktionen multipliziert mit der Meßfläche ΔA erhält.
Diese Gleichung kann als Grundlage für die Massebestimmung nach einem Scanning-Verfahren mit digitaler Auswertung dienen (s. Scanning-Verfahren).
Mit $A = n\Delta A$ erhält man aus Gl. (6.27b)

$$M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} A \frac{\sum_{i=1}^{n} E_{\lambda,i}}{n}, \tag{6.27c}$$

wobei das arithmetische Mittel der zu messenden Extinktionen abgekürzt als mittlere Extinktion

$$\bar{E}_\lambda = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} E_{\lambda,i} = \frac{1}{n} (E_{\lambda,1} + E_{\lambda,2} + \ldots + E_{\lambda,n}) \tag{6.28}$$

bezeichnet wird.
Man erhält damit die zu Gl. (6.26) analoge Gleichung

$$M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} \bar{E}_\lambda A, \tag{6.29}$$

wonach die Masse der absorbierenden Substanz eines biologischen Gebildes, z. B. eines Zellkerns, aus dem Produkt der Fläche des Zellkerns und der über diese Fläche gemittelten Extinktion erhalten wird. Diese Gleichung ist grundlegend für wichtige Verfahren zur Massebestimmung einer absorbierenden Substanz.
Die beiden Größen $\bar{E}_\lambda$ und A in Gl. (6.29) können unabhängig voneinander bestimmt werden, was meßtechnische Vorteile haben kann. Ferner ist es häufig wünschenswert, die beiden Informationen mittlere Extinktion und Fläche getrennt zur Verfügung zu haben. Die Fläche A kann z. B. durch Planimetrieren einer Mikrofotografie des Zellkerns bestimmt werden, während die mittlere Extinktion durch eine große Anzahl von Punktmessungen erhalten wird. Die Automatisierung der Messungen ist mit einem Scanning-Verfahren möglich. Die Größe der Meßfläche ΔA für die Bestimmung der Extinktionen $E_{\lambda,i}$ und der daraus zu gewinnenden mittleren Extinktion $\bar{E}_\lambda$ sollte so klein sein, daß innerhalb derselben die Extinktion als konstant angenommen werden kann. Andererseits darf sie aufgrund beugungstheoretischer Überlegungen eine untere Grenze nicht unterschreiten.
Zu kleine Meßflächen haben auch den Nachteil, daß der hindurchtretende Strahlungsfluß zu gering ist und somit im Strahlungsempfänger ein zu ungünstiges Signal-Rausch-Verhältnis erzeugt wird. Als kleinste Meßflächen sind quadratische oder kreisförmige Meßflächen mit Dmr. 1 bis 0,25 μm gebräuchlich.
Der Vollständigkeit halber sei die Integralformel zur Massebestimmung angeführt, die sich aus Gl. (6.27a) ergibt, wenn die Masseelemente bzw. die Volumenelemente differentiell klein werden:

$$M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} \iint_A E_\lambda (x, y) \, dA. \tag{6.30}$$

Das Flächenintegral der ortsabhängigen Extinktion ist über die Fläche des betrachteten biologischen Gebildes, z. B. des Zellkerns, zu erstrecken.

Unabhängigkeit der Massebestimmung von Konzentrationsänderung in z-Richtung

Bisher hatte man angenommen, daß die Konzentration der absorbierenden Substanz in dem Meßvolumen ΔV konstant sei [s. Bild 6.125 und Gl. (6.26a)]. Man nimmt nunmehr an, daß sich die Konzentration längs der Richtung des Strahlungsflusses durch das Meßvolumen, die man als z-Richtung bezeichnet, ändert. Es sei $c = c(z)$. In dem differentiell kleinen Volumenelement $dV = \Delta A \, dz$ des Meßvolumens ΔV (Bild 6.126) ist die differentiell kleine Masse

$$dM = c(z) \, dV = c(z) \Delta A \, dz$$

enthalten. Die Masse ΔM im Meßvolumen ΔV mit der Schichtdicke d ergibt sich daraus durch Integration längs der z-Richtung:

$$\Delta M = \int_0^d dM = \Delta A \int_0^d c(z) \, dz.$$

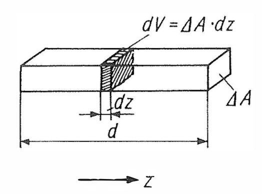


Bild 6.126. Zur fotometrischen Bestimmung der Menge einer absorbierenden Substanz in einem Volumenelement, wenn sich die Konzentration in Lichtrichtung (z-Richtung) ändert

Führt man die mittlere Konzentration

$$\bar{c} = \frac{1}{d} \int_0^d c(z)\, dz \tag{6.31}$$

ein, so erhält man

$$\Delta M = \bar{c} \Delta A d = \bar{c} \Delta V. \tag{6.32}$$

Die Extinktion längs des differentiell kleinen Schichtelements dz beträgt aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$dE_\lambda = \varepsilon_\lambda c\,(z)\, dz.$$

Hieraus folgt die Extinktion längs des Meßvolumens mit der Schichtdicke d

$$E_\lambda = \int_0^d dE_\lambda = \varepsilon_\lambda \int_0^d c(z)\, dz$$

oder mit der mittleren Konzentration $\bar{c}$ nach Gl. (6.31)

$$E_\lambda = \varepsilon_\lambda \bar{c} d. \tag{6.33}$$

Aus den Gln. (6.32) und (6.33) folgt somit

$$\Delta M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} E_\lambda \Delta A.$$

Aufgrund der Herleitung dieser Gleichung, die mit der Gl. (6.26a) übereinstimmt, ergibt sich, daß die im Meßvolumen ΔV enthaltene Masse ΔM der absorbierenden Substanz durch Messung der Extinktion E_λ und der Meßfläche ΔA auch dann richtig erhalten wird, wenn die Konzentration in Lichtrichtung nicht konstant ist, sondern sich nach einer beliebigen Funktion $c = c(z)$ ändert. Die bisher angenommene Voraussetzung einer homogenen Substanzverteilung im Meßvolumen ist somit nicht erforderlich.

Absolute und relative Mengenangaben – Häufigkeitsdiagramm

In der Zytofotometrie wird häufig anstelle der Masse der absorbierenden Substanz (absolute Masseangabe in 10^{-12} g), die die Kenntnis des speziellen Extinktionskoeffizienten voraussetzt, der Wert $\bar{E}_\lambda A$ (mittlere Extinktion × Fläche) angegeben, der der Masse nach Gl. (6.29) proportional ist und der in der sog. Arbeitseinheit (engl. „Arbitrary Unit") ausgedrückt wird. Die Maßeinheit für die Arbeitseinheit AE bzw. AU ist μm², wenn die Fläche in μm² ausgedrückt wird.
Bei grafischen Darstellungen der Meßwerte, die aus einer Vielzahl von Zellen gewonnen wurden, trägt man die Arbitrary-Units als Abszisse und die Zellanzahl als Ordinate auf (Häufigkeitsdiagramm). Ein Beispiel wird im Bild 6.127 gezeigt.
Bei der Auswertung sind die Gesetzmäßigkeiten der Statistik zu beachten [346] [348].

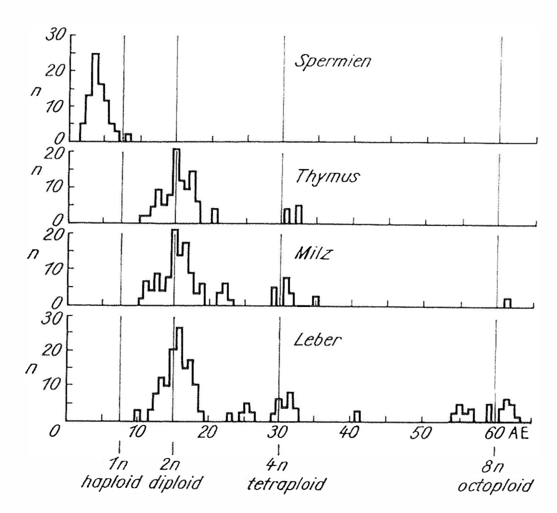


Bild 6.127. Grafische Darstellung der Meßergebnisse von verschiedenen menschlichen Zellkernen (Ribonukleasebehandlung, Gallocyanin-Chromalaun-Färbung)

n = Zellzahl;
AE = Extinktion × Fläche (μm²) = relativer Farbstoffgehalt (nach *Sandritter* und Mitarb., 1963)

Plug-Methode

Die Plug-Methode ist eine vereinfachte Methode zur Mengenbestimmung einer absorbierenden Substanz, die anwendbar ist, wenn die Substanz in einem Volumen enthalten ist, das eine einfache geometrische Gestalt hat [339]. So kann mit der Plug-Methode der Farbstoffgehalt feulgengefärbter Kerne von kugelförmiger oder ähnlicher Gestalt, wie sie in vielen biologischen Zellen vorkommen, ermittelt werden.
Die Methode beruht darauf, daß das kreisförmige Meßfeld zentrisch zur Kernmitte eingestellt

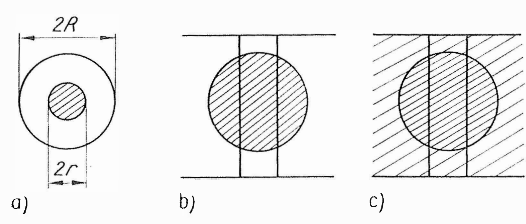


Bild 6.128. Zur Bestimmung der Menge einer absorbierenden Substanz in einem kugelförmigen Zellkern mit der Plug-Methode

a) Draufsicht: 2r Durchmesser des Meßfelds, 2R Durchmesser des Zellkerns;
b) Schnitt durch einen Zellkern in absorptionsfreier Umgebung;
c) in absorbierender Umgebung mit dem zentralen Plug

und so groß gewählt wird, daß der zum Strahlungsempfänger gelangende Strahlungsfluß durch einen größeren zylinderförmigen Teil des Kerns (Plugs) hindurchgeht (Bilder 6.128a, b und c). Es werden die Strahlungsabsorption innerhalb des Plugs und der Vergleichswert durch eine Leerstelle gemessen und daraus die Extinktion E_{Plug} ermittelt oder am Meßgerät unmittelbar abgelesen.

Den Gesamtgehalt M_K der absorbierenden Substanz, die mit der Konzentration c in dem Zellkern vom Volumen V_K enthalten ist, erhält man nach

$$M_K = cV_K = cV_{\text{Plug}} \frac{1}{v}$$

oder

$$M_K = M_{\text{Plug}} \frac{1}{v}, \tag{6.34}$$

wobei

$$v = \frac{V_{\text{Plug}}}{V_K} \tag{6.35}$$

das Verhältnis der Rauminhalte des Plugs und des Zellkerns ist.

Der Substanzgehalt im Plug-Volumen ergibt sich nach der grundlegenden Gl. (6.29) zu

$$M_{\text{Plug}} = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} \bar{E}_{\lambda,\text{Plug}} A_{\text{Plug}}.$$

Hiernach müßte, wie in jedem anderen größeren Meßvolumen, die mittlere Extinktion aus vielen Punktmessungen ermittelt werden. Doch gerade das will man bei der Plug-Methode vermeiden, bei der man nur mit einer Messung – abgesehen von der zusätzlich erforderlichen Leerwertmessung – die Strahlungsabsorption im Plug-Volumen erfaßt. Wir bezeichnen die so gemessene Extinktion im Plug mit E_{Plug}. Es gilt näherungsweise

$$M_{\text{Plug}} = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} E_{\lambda,\text{Plug}} A_{\text{Plug}}. \tag{6.36}$$

Exakt wäre die Gleichung dann gültig, wenn das Volumen des Plugs durch parallele Planflächen begrenzt wäre [entsprechend den Voraussetzungen der Gl. (6.26)]. Bei einem kugelförmigen Zellkern ist der Plug durch sphärische Flächen begrenzt. Es ist leicht einzusehen, daß der Fehler von der Größe des Plugs abhängig ist. Bei einem sehr schmalen zentralen Plug ist der Fehler praktisch Null. Erfaßt der Plug den ganzen Kern, so ist er am größten. Meistens wird eine mittlere Größe des Plugs gewählt, die sich aus mehreren Gründen als zweckmäßig erweist. Dann ist der Fehler gering (etwa $< 2\%$).

Zur Ermittlung des Gesamtgehalts an absorbierender Substanz ist außer der Kenntnis des Substanzgehalts im Plug noch die Kenntnis des Volumenverhältnisses v erforderlich.

Für einfach gestaltete Körper läßt sich die Größe v berechnen. Falls das Volumen V_K die Gestalt einer Kugel mit dem Radius R und das Meßfeld bzw. der Plug den Radius r hat (Bild 6.128a), ergibt sich

$$v = 1 - \left(1 - \frac{r^2}{R^2}\right)^{3/2}.$$

Für einige Werte von r/R ist in Tafel 6.7 das zugehörige v angegeben. Ausführliche Tafel siehe z.B. [351].

Mit $A_{\text{Plug}} = \pi r^2$ erhält man als Endgleichung zur Bestimmung des Gesamtgehalts an absorbierender Substanz im kugelförmigen Zellkern

$$M_K = \frac{1}{\varepsilon_\lambda} E_{\lambda\ \text{Plug}} \frac{\pi r^2}{v}.$$

Tafel 6.7. Werte für das Verhältnis r/R

r/R	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
v	0,015	0,059	0,132	0,230	0,351	0,488	0,636	0,784	0,917	1,000

Für relative Messungen reicht die Bestimmung der Größe

$$E_{\lambda\,\mathrm{Plug}}\;\frac{r^2}{v}$$

aus, die z.B. dem Farbstoffgehalt feulgengefärbter kugelförmiger Kerne proportional ist. Außer der fotometrischen Messung von $E_{\lambda\,\mathrm{Plug}}$ sind noch die Messung des Kerndurchmessers, den man z.B. durch Ausmessen mit einem Meßokular oder durch Ausmessen einer Fotografie erhalten kann, und die Kenntnis der Größe des Meßfelds erforderlich. Eine Tafel zur Bestimmung des geometrischen Faktors r^2/v in Abhängigkeit vom Plugdurchmesser bzw. Meßfelddurchmesser $2r$ und Kugeldurchmesser $2R$ geben *Swift* und *Rasch* [351] an. Dieselben Verfasser geben eine Gleichung an, wenn die Kerne nicht vollkommene Kugeln, sondern Sphäroide sind. Außerdem erläutern sie, wie der Einfluß eines absorbierenden Umfelds (Bild 6.128c) durch weitere Messungen eliminiert werden kann.

Inhomogenitätsfehler

Die im vorhergehenden Abschnitt angegebenen Gleichungen zur Bestimmung der Menge einer absorbierenden Substanz bzw. des Farbstoffgehalts haben zur Voraussetzung, daß die Substanz bzw. der Farbstoff gleichmäßig im Zellkern verteilt ist. Das ist fast nie der Fall, wodurch die durch die Plug-Methode erhaltenen Meßwerte fehlerhaft werden. Es ist wichtig, sich eine Vorstellung darüber zu verschaffen, wie groß die entstehenden Fehler sein können.

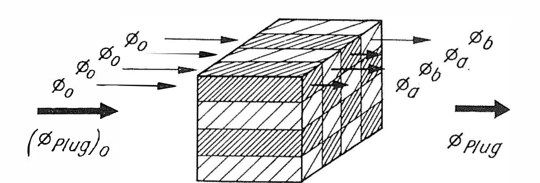


Bild 6.129. Zur fotometrischen Bestimmung der Menge einer absorbierenden Substanz mittels der Plug-Methode bei inhomogener Verteilung der Substanz

Anhand eines Modellpräparats läßt sich dieser Fehler berechnen. Wir betrachten von parallelem Licht durchlaufene quaderförmige Körper, deren Eintritts- bzw. Austrittsflächen durch ein rechteckiges Meßfeld begrenzt werden (Bild 6.129). Diese Körper können als Teil (Plug) größerer Körper aufgefaßt werden. In dem Plug sei eine bestimmte Substanzmenge enthalten, die inhomogen verteilt ist, und zwar in n kleine untereinander gleiche Volumina mit der Grundfläche ΔA, wobei in $n/2$ dieser Volumina die Konzentration $c_a > c$ und in der anderen Hälfte dieser Volumina die Konzentration $c_b < c$ sei. Die Konzentration bei homogener Substanzverteilung ist c. Der Quotient der Konzentrationen $\varkappa = c_b/c_a$ ist ein Maß für die Inhomogenität: Die Anordnung der Volumina kann von dem im Bild gezeigten Schachbrettmuster abweichen.

Den bei der Plug-Methode ein- und austretenden Strahlungsfluß $(\Phi_{\mathrm{Plug}})_0$ und Φ_{Plug} kann man sich in Strahlungsflüsse durch die n kleinen Volumina zerlegt denken. Man mißt

$$E_{\mathrm{Plug}} = \lg \frac{1}{\vartheta_{\mathrm{Plug}}} = \lg \frac{(\Phi_{\mathrm{Plug}})_0}{\Phi_{\mathrm{Plug}}}$$

$$= \lg \frac{n\Phi_0}{(n/2)\,\Phi_a + (n/2)\,\Phi_b}$$

und erhält für die im Plug enthaltene absorbierende Substanz

$$M_{\mathrm{Plug}} = \frac{1}{\varepsilon_\lambda}\,E_{\mathrm{Plug}}A_{\mathrm{Plug}}.$$

Der dabei auftretende Fehler in der Mengenbestimmung wird durch die Beziehung

$$\Delta M = M_{\mathrm{Plug}} - M = \frac{1}{\varepsilon_\lambda}\,A_{\mathrm{Plug}}\,(E_{\mathrm{Plug}} - \bar{E})$$

ausgedrückt, wobei $\bar{E}$ die durch Punktmessungen bzw. durch eine Scanning-Methode erhaltene mittlere Extinktion ist, die zur richtigen Substanzmenge führt.

Für den Zusammenhang zwischen E_{Plug} und $\bar{E}$, für inhomogene Substanzverteilung verschiedenen Grades, erhält man die Beziehung

$$E_{\mathrm{Plug}} = \lg \frac{2}{10^{-[2/(1+\varkappa)]\,\bar{E}} + 10^{-[2\varkappa/(1+\varkappa)]\,\bar{E}}}$$

die im Bild 6.130a grafisch dargestellt ist. Der relative Fehler $\Delta E/\bar{E} = (E_{\mathrm{Plug}} - \bar{E})/\bar{E}$, der mit dem relativen Fehler der Substanzmenge $\Delta M/M$ übereinstimmt, ist im Bild 6.130b dargestellt.

Die durch die Plug-Methode ermittelte Extinktion ist bei inhomogener Substanzverteilung immer kleiner als die mittlere Extinktion. Diesen Fehler der Plug-Methode bezeichnet man als Inhomogenitätsfehler oder Verteilungsfehler.

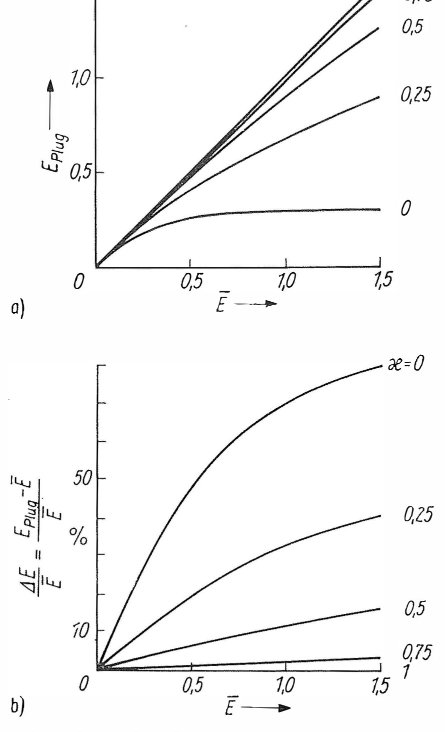


Bild 6.130. Zum Inhomogenitätsfehler eines Modellpräparats nach Art von Bild 6.129

Auf der Abszisse ist die (wahre) mittlere Extinktion aufgetragen, die der Substanzmenge proportional ist. Auf der Ordinate sind die durch die Plug-Methode gemessene Extinktion E_{Plug} (a) sowie der durch die Plug-Methode entstehende relative Fehler $\Delta E/\bar{E}$ aufgetragen, der mit dem relativen Fehler der Substanzmenge $\Delta M/M$ übereinstimmt. Die Kurvenparameter geben den Grad der Inhomogenität an. Es bedeuten $\varkappa = 1$ ($c_a = c_b = c$) homogene Substanzverteilung; $\varkappa = 0$ ($c_a = 2_c$, $c_b = 0$) extrem inhomogene Substanzverteilung. Die anderen $\varkappa$-Werte ergeben dazwischenliegende inhomogene Substanzverteilungen

$\varkappa = 0{,}75$: $c_a = 1{,}14c$; $c_b = 0{,}86c$
$\varkappa = 0{,}50$: $c_a = 1{,}33c$; $c_b = 0{,}67c$
$\varkappa = 0{,}25$: $c_a = 1{,}6c$; $c_b = 0{,}4c$

Er kann durch die Zweiwellenlängenmethode [267] [309] bis [312] [326] [327] [351] [367] oder durch Scanningverfahren vermieden werden.

Mengenbestimmung bei Mehrstoffsystemen

Bisher wurde angenommen, daß nur eine absorbierende Substanz vorliegt. Enthält das Meßobjekt zwei absorbierende Substanzen, z. B. Nukleinsäure im Kern und Protein in dem umgebenden Zellplasma, so müssen zwei Extinktionsmessungen bei unterschiedlichen Wellenlängen vorgenommen werden, um die Menge der einen Substanz zu erhalten [304]. Soll noch zusätzlich der Streulichteinfluß berücksichtigt werden, so erfordert ein Zweistoffsystem drei Extinktionsmessungen bei verschiedenen Wellenlängen. Zur Bestimmung der Menge der Nukleinsäure bei gleichzeitig vorhandenem Protein gab *Sandritter* [342] die Beziehung

$$E_{\text{NS}} = 0{,}92\,E_{265} - 0{,}75\,E_{280} - 0{,}25\,E_{313} \quad (6.37)$$

an, die die Ermittlung der Extinktion bei den drei Wellenlängen $\lambda = 265$, 280, 313 nm erfordert, um die Extinktion zu erhalten, die allein durch die Nukleinsäure bedingt ist. Die Wellenlängen entsprechen etwa dem Maximum der Absorption der Nukleinsäuren (260 nm) und der Proteine (280 nm). Der letzte Term trägt der unspezifischen Absorption bei 313 nm Rechnung, die ihre Ursache in der Lichtstreuung hat. Eine ähnliche Beziehung haben *Sandritter* und Mitarbeiter [345] für die Proteinbestimmung empfohlen.

Einfluß des Streulichts und Streulichtkorrekturen

Tritt beim Durchgang von Strahlung durch das zu messende Objekt außer der Absorption eine Streuung der Strahlung am Objekt auf, so kann dies zu Meßfehlern führen. In der Gl. (6.37) ist die Streulichtkorrektur durch den dritten Term berücksichtigt.

Zur Erfassung des Streulichtanteils mißt man die Streulichtabsorption bei mindestens zwei Wellenlängen in einem Bereich, in dem keine echte Absorption auftritt, und extrapoliert in den Bereich der echten Absorption [255]. Durch Subtraktion der Streulichtabsorption von der Gesamtabsorption erhält man die streulichtkorrigierte Absorption.

Die Gesetzmäßigkeit der Streuung in Abhängigkeit von der Wellenlänge ist für im Vergleich zur Wellenlänge kleine Partikeln von *Rayleigh* angegeben worden. Es ist das bekannte $1/\lambda^4$-Gesetz. Für mikroskopische Präparate macht man für den Streulicht-Extinktionskoeffizienten ε_λ in Anlehnung an die Rayleighsche Beziehung den Ansatz

$$\varepsilon_\lambda = K \frac{1}{\lambda^n} \quad (6.38)$$

und bestimmt den Exponenten n experimentell nach der Gleichung

$$n = \frac{\lg \varepsilon_{\lambda 1} - \lg \varepsilon_{\lambda 2}}{\lg \lambda_2 - \lg \lambda_1}. \quad (6.39)$$

Trägt man als Abszisse $\lg \lambda$ und als Ordinate $\lg \varepsilon_\lambda$ für mehrere Wertepaare auf, so ergibt sich eine Gerade, wenn n konstant ist. Das ist in einem

nicht zu großen Spektralbereich im allgemeinen der Fall. In Abhängigkeit von der Vorbehandlung von Gewebeschnitten und der Struktur der Gewebeeiweiße wurden Werte für n ermittelt, die zwischen 2,5 und 4 liegen.

Das durch das Präparat bedingte Streulicht wird vermindert oder weitgehend vermieden, wenn sich die Brechzahl des Einschlußmittels möglichst wenig von der Brechzahl des Objekts unterscheidet. Mißt man über größere Wellenlängenbereiche, so sollte auch die Dispersion des Einschlußmittels der Dispersion des Objekts angepaßt sein.

Pollister und *Ornstein* [330] empfehlen für den sichtbaren Bereich die Einbettung in Öl mit $n = 1{,}53$ bis $n = 1{,}57$ in Schritten von 0,01, wobei die Prüfung auf Streulicht visuell bei Dunkelfeldbeleuchtung mit weißem Licht erfolgen soll. Dabei sei eine sehr befriedigende Anpassung der Brechzahl und der Dispersion möglich. Weitere Hinweise siehe [289] [343] [351]. Auch mit dem Phasenkontrastverfahren läßt sich die Wahl des Einschlußmittels für ungefärbte Präparate erleichtern [282]. Im ultravioletten Gebiet werden als Einbettungsmittel Glyzerin, Glyzerinchloralhydrat, Methakrylat, Celodal oder modifiziertes Epon [372] verwendet.

Bei mikrofotometrischen Messungen ist noch eine andere Art von Streulicht zu berücksichtigen, die verschiedene Ursachen hat. Es handelt sich um den Schwarzschild-Villiger-Effekt, der auch unter der Kurzbezeichnung SV-Effekt bekannt ist. Ist ein stark absorbierendes Objektdetail von einem Gebiet geringer Absorption umgeben, so kann bei der Messung des absorbierenden Objektdetails ein Meßfehler auftreten, der eine zu geringe Absorption ergibt. Die von den verschiedenen Objektstellen ausgehenden abbildenden Strahlenbündel gelangen nicht völlig ungestört zu den ihnen zugeordneten Bildorten, sondern es entsteht auf dem Weg durch das optische System durch innere Reflexionen ein unerwünschter Falschlichtanteil, der sich dem ungestörten, intensitätsrichtigen Bild überlagert. Man kann den SV-Effekt möglichst klein halten, wenn man das Objekt nicht vollständig, sondern nur das jeweils interessierende Objektdetail beleuchtet. Prinzipiell ist der Falschlichtanteil nicht völlig vermeidbar und hängt auch vom Objektivtyp ab. Eine zu große Kondensorapertur wirkt begünstigend auf den SV-Effekt. Den Einfluß des SV-Effekts auf mikrofotometrische Messungen hat *Naora* [321] besonders herausgestellt, jedoch mehrfach Kritik hinsichtlich der Überbewertung dieses Effekts erhalten.

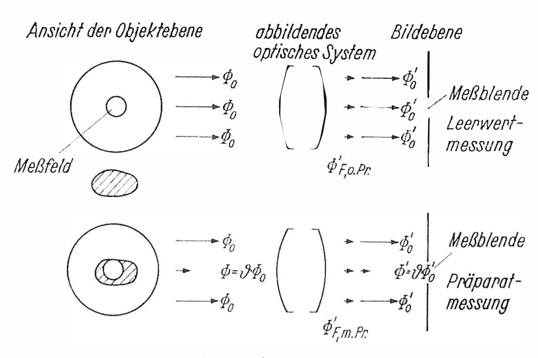


Bild 6.131. Schwarzschild-Villiger-Effekt

Im folgenden wird anhand einer schematischen Darstellung (Bild 6.131) der SV-Effekt quantitativ erläutert. In der Leerwertmessung (ohne Präparat, o. Pr.) geht von allen Stellen des Objektfelds der gleiche Strahlungsfluß Φ_0 aus, der bildseitig in einen ungestörten Anteil Φ_0' und einen Falschlichtanteil $\Phi'_{F,\,o.\,Pr.}$ aufgespalten werden kann. Durch die Meßblende gelangt der Strahlungsfluß

$$\text{Leerwertmessung} = \Phi_0' + \Phi'_{F,o.Pr.},$$

der gleich Φ_0 ist, wenn man Absorptions- und andere Verluste vernachlässigt. Bei Verschiebung des Präparats an den Ort des Meßfelds tritt durch das Objektdetail der Strahlungsfluß $\Phi = \vartheta\Phi_0$, wobei ϑ die gewünschte Meßgröße ist und sich der Falschlichtanteil etwas ändert. Er sei $\Phi'_{F,\,m.\,Pr.}$. Durch die Meßblende gelangt der durch das Präparat geschwächte Strahlungsfluß $\Phi' = \vartheta\Phi_0'$, überlagert durch den Falschlichtanteil $\Phi'_{F,\,m.\,Pr.}$:

$$\text{Präparatmessung} = \vartheta\Phi_0' + \Phi'_{F,m.Pr.}.$$

Der Quotient aus beiden Messungen ergibt den scheinbaren Reintransmissionsgrad

$$\vartheta_S = \frac{\vartheta\Phi_0' + \Phi'_{F,m.Pr.}}{\Phi_0' + \Phi'_{F,o.Pr.}}. \tag{6.40a}$$

Führt man als relativen Falschlichtanteil die Größe

$$i = \frac{\Phi'_{F,o.Pr.}}{\Phi_0'} \tag{6.41}$$

ein und beachtet, daß

$$\Phi'_{F,m.Pr.} = \xi\Phi'_{F,o.Pr.} \quad \text{mit} \quad 0 < \xi < 1$$

gilt, so erhält man

$$\vartheta_S = \frac{\vartheta + (\Phi'_{F,m.Pr.}/\Phi_0')}{1 + (\Phi'_{F,o.Pr.}/\Phi_0')} = \frac{\vartheta + \xi i}{1 + i}$$

oder

$$\vartheta_S = \vartheta + \frac{i(\xi - \vartheta)}{1 + i}. \qquad (6.40\text{b})$$

Ein häufiger Sonderfall wird sein, daß $\xi \approx 1$ (d.h. $\Phi'_{F,\,m.\,Pr.} \approx \Phi'_{F,\,o.\,Pr.}$) ist, der dann auftritt, wenn das Präparat nicht völlig aus dem beleuchteten Objektfeld entfernt, sondern nur geringfügig verschoben wird. Man erhält dann

$$\vartheta_S = \vartheta + \frac{i(1 - \vartheta)}{1 + i}.$$

Aus der folgenden, hieraus umgeformten Gleichung kann man den tatsächlichen Reintransmissionsgrad ϑ aus dem gemessenen scheinbaren Reintransmissionsgrad ϑ_S errechnen, wenn der relative Falschlichtanteil i bekannt ist:

$$\vartheta = \vartheta_S - i(1 - \vartheta_S). \qquad (6.42)$$

An Modellpräparaten läßt sich i bestimmen [272] [273]. Beispiel: $\vartheta_s = 0{,}2$ (oder 20%) und somit $E_s = 0{,}699$ (s. Tafel 6.6). Ferner sei $i = 0{,}01$ (oder 1%). Dann wird $\vartheta = 0{,}2 - 0{,}01\,(1 - 0{,}2) = 0{,}192$ oder $E = 0{,}717$. Als relativer Fehler der Extinktion ergibt sich $(E_s - E)/E = -0{,}018/0{,}717 = -0{,}025$ oder 2,5%.

Scanningverfahren

Bei dem Scanningverfahren in der Mikrofotometrie wird das strukturierte Objekt durch ein kleines Meßfeld abgetastet, wobei entweder das Objekt oder das Meßfeld bewegt wird. Eine wesentliche Aufgabe des Scanningverfahrens besteht in der Vermeidung des Inhomogenitätsfehlers bei der Mengenbestimmung absorbierender Objekte. Das Scanningverfahren ermöglicht eine digitale Erfassung mikroskopischer Objekte, die dazu benutzt werden kann, das Objekt durch eine Rechenanlage zu analysieren.

Man kann dem mikroskopischen Objekt eine Scanningmatrix

$$\mathfrak{S}_\lambda = \begin{pmatrix} E_{11} & E_{12} & \dots & E_{1n} \\ E_{21} & E_{22} & \dots & E_{2n} \\ \vdots & & & \\ E_{m1} & E_{m2} & \dots & E_{mn} \end{pmatrix}$$

zuordnen, bei der die Matrixelemente $E_{j,k}$ die Extinktion am Meßort $X_{j,k}$ darstellen (Bild 6.132). Die Scanningmatrizen sind von der Wellenlänge abhängig. Als Grundlage für die Mengenbestimmung dient hierbei Gl. (6.27b) oder Gl. (6.29). Die Scanning-Matrizen eines mikroskopischen Objekts ermöglichen darüber hinaus auch Aussagen über die Größe der Objekteinzelheiten, über ihre geometrische Gestalt und andere Eigenschaften des Objekts. Im Prinzip kann – lediglich begrenzt durch die kleinstmögliche Meßfeldgröße – die im mikroskopischen Objekt enthaltene Information in eine große Anzahl von Zahlenwerten umgewandelt, gespeichert oder direkt einer Rechenanlage zugeführt werden, die mit geeigneten Programmen eine Analyse und Klassifizierung

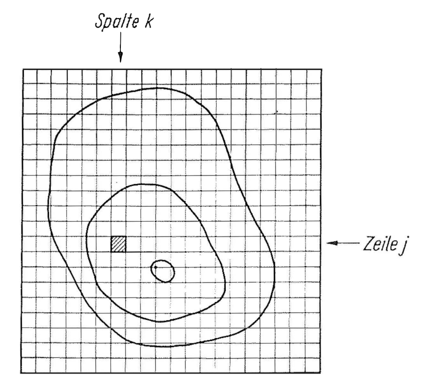


Bild 6.132. Erfassung des Informationsgehalts einer Zelle (schematisch) durch eine Scanningmatrix
schraffiert: Am Meßort X_{jk} (j te Zeile, k-te Spalte) wird die Extinktion E_{jk} gemessen

der Objekte ermöglicht. So können z.B. mit dem Scanningverfahren normale und pathologische Zellen automatisch differenziert werden [347] [363] [368].

In dieser Hinsicht stehen wir sicher erst am Anfang einer weitreichenden Entwicklung (s.a. Abschnitt 9.5.).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, den Abtastvorgang zu realisieren. Beim Flyingspotverfahren wird ein Lichtpunkt zeilenweise über das Objekt hinweg bewegt, so daß jeweils nur die Meßstelle beleuchtet ist. Als Lichtquelle dient im allgemeinen der auf dem Leuchtschirm einer Braunschen Röhre durch den abtastenden Elektronenstrahl erzeugte Leuchtfleck, der durch ein optisches System in die Objektebene abgebildet wird. Ein einfaches mechanisches Flying-spot-Mikroskop, bei dem der abtastende Leuchtfleck durch eine rotierende Scheibe mit spiralig angeordneten Löchern erzeugt wird, beschreibt *Jansen* [290]. Nach einem vom Fernsehen her bekannten Prinzip wird eine Fernsehaufnahmeröhre zur elektronisch gesteuerten Bildabtastung benutzt. Hierbei ist das gesamte abzutastende Objektfeld zu beleuchten. Eine mechanisch gesteuerte Bildab-

tastung wird in dem von *Deely* [266] beschriebenen integrierenden Mikrodensitometer verwendet, bei dem die Meßblende das Bild zeilenförmig abtastet. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, das Objekt mit dem Tisch (mäanderförmig) zu bewegen, während die Meßblende ortsfest bleibt: mechanisches Tisch-Scanningverfahren. Es hat den Vorteil, daß das jeweils gemessene Objektdetail in der optischen Achse liegt, so daß etwaige Abbildungsfehler im Objektfeld eines Mikroskopobjektivs unwirksam bleiben. Außerdem lassen sich Vorblende und Meßblende einfach einander zuordnen. Der Nachteil besteht darin, daß die Scanningtischbewegung nicht beliebig schnell erfolgen kann und einen höheren Aufwand als die anderen mechanischen Abtastverfahren erfordert (Beispiele: UMSP I und Cytoscan der Firma Opton). Außer den genannten Verfahren gibt es noch Abwandlungen, z.B. die Scanningbewegung einer Linse, die hinter dem Objektiv angeordnet ist und das vom Objektiv erzeugte Bild an einer feststehenden Meßblende vorbeiführt [261]. In dem registrierenden Doppelstrahl-Mikroskopspektralfotometer von *Beckman* wird eine Kombination des Flying-spot-Prinzips und der mechanischen Tischbewegung benutzt, wobei ein Schwingspiegel einen Leuchtfleck längs einer Zeile über das Objekt hinweg bewegt, während in der dazu senkrechten Richtung der Tisch schrittweise durch einen Schrittmotor verschoben wird. Grundsätzlich können auch mikrofotografische Aufnahmen durch Scanningverfahren mit einem geeigneten Densitometer ausgewertet werden.

6.1.7.3. Auswahl einiger typischer kommerzieller Geräte

Mikroskope für fotografische Fotometrie

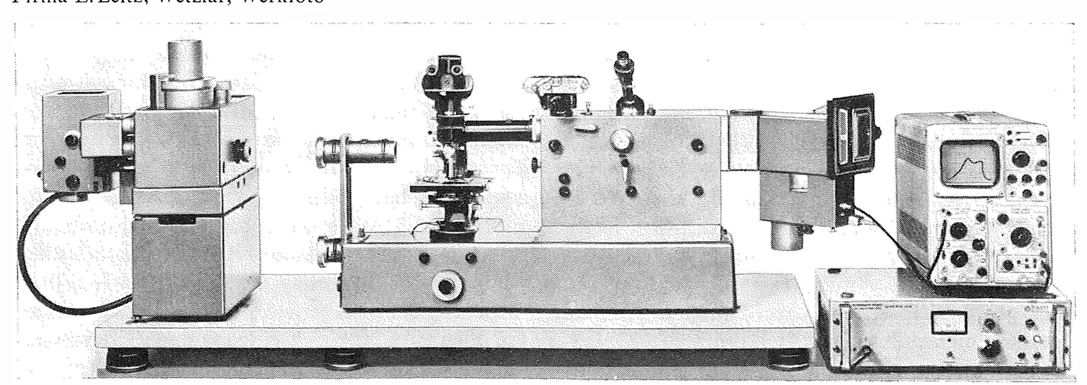
Bei der fotografischen Fotometrie wird von dem mikroskopischen Objekt zuerst eine fotografische Aufnahme hergestellt, deren Schwärzung mit einem Mikrodensitometer auszuwerten ist. Die Auswertung erfordert, daß als Referenzsystem ein geeichter Graukeil, ein Stufenfilter oder ein rotierender Sektor mit definierten Extinktionsstufen an einer gleichmäßig beleuchteten Stelle (Leerstelle) der gleichen Fotoplatte aufbelichtet wird. Durch die Belichtung von Bild und geeichtem Referenzsystem auf ein und dieselbe Fotoplatte unterliegen beide Aufnahmen, die entweder nacheinander mit gleicher Belichtungszeit oder gleichzeitig erhalten werden, den gleichen Entwicklungsbedingungen, wodurch die Meßergebnisse weitgehend fehlerfrei sind. Zur Ermittlung der Extinktion des Objekts müssen die Schwärzungen, die von der interessierenden Präparatstelle und vom Umfeld erzeugt worden sind, mit den über das Referenzsystem erhaltenen Schwärzungen verglichen werden. Dazu stellt man sich eine Schwärzungskurve her, bei der die densitometrisch gemessenen Schwärzungen des Referenzsystems den geeichten Extinktionswerten zugeordnet werden (Abszisse: geeichte Extinktionswerte, Ordinate: gemessene Schwärzung). Der gemessenen Schwärzung einer beliebigen Präparatstelle wird anhand der Schwärzungskurve die Extinktion zugeordnet. Weitere Hinweise siehe in [260] [275][301][329] [336][359].
Obwohl das Verfahren der fotografischen Fotometrie im Vergleich zur lichtelektrischen Fotometrie (Direkt-Fotometrie) den Umweg über die fotografische Platte erfordert, hat es eine Reihe von Vorteilen. Die fotografische Aufnahme mit dem aufbelichteten Referenzsystem ist ein bleibendes Dokument, das außer der qualitativen auch die quantitative Information über das Objekt enthält. Es kann nach verschiedenen Gesichtspunkten ausgewertet werden. Meß- und Auswertestadium sind getrennt. Sehr schwache Intensitäten lassen sich durch längere Belichtungszeiten nachweisen.
Das UV-Mikroskop des VEB Carl Zeiss JENA (Bild 6.116) gehört zu den einfachen Mikroskopen, die für fotografische Fotometrie eingerichtet sind. Sie wird dadurch ermöglicht, daß vor der Fotoplatte der Spiegelkamera ein Blendeneinsatz angeordnet ist, der ein elfstufiges Platinfilter enthält. Blendeneinsatz mit Fotoplatte sind relativ zum Bildfeld des Mikroskops verschiebbar, so daß Objekt und Platinstufenfilter nacheinander etwa in Bildfeldmitte gerückt werden können. Die Aufnahmen erfolgen dementsprechend zeitlich nacheinander, jedoch auf derselben Fotoplatte.
Das UV-Mikroskop ist auch für lichtelektrische Messungen geeignet. Anstelle der Kamera wird ein lichtelektrischer Strahlungsempfänger aufgesetzt. In Verbindung mit einem Monochromator kann man das UV-Mikroskop für mikrospektralfotometrische Untersuchungen einsetzen. Zusätze erlauben die Durchführung von Fluoreszenzfotometrie [334].
Ein UV-Mikroskop für fotografische Fotometrie mit wesentlich größerem Aufwand ist das sowjetische Gerät *МУФ*-6 (Bild 6.133) [329]. Es unterscheidet sich von dem oben beschriebenen vor allem durch einen eingebauten Gittermonochromator, der zusammen mit den verwende-

Bild 6.133. UV-Mikroskop MYФ–6
LOMO (Leningrad)
Optikschema
1 Strahlungsquelle; *5* bis *8* Gittermonochromator; *13*, *31*, *35* Umlenkspiegel für abgezweigten Strahlengang; *15*, *37*, *21* Umlenkspiegel für Auflichtstrahlengang; *14* Umlenkspiegel für Durchlichtstrahlengang; *20* Objektiv; *22* Okular; *23* UV-Projektiv; *25* Bildwandler; *28* Fotoplatte; *16* Küvette; *17* Filterrevolver

ten Strahlungsquellen (Quecksilberdampflampe, Glühlampe) einen nutzbaren Wellenlängenbereich von 250 bis 700 nm ergibt. Ein Teil der Strahlung wird nach Durchgang durch den Monochromator aus dem Strahlengang abgezweigt und dient zur gleichzeitigen Belichtung eines Graukeils auf einen Teil der Fotoplatte. Das UV-Bild wird mit einem elektronenoptischen Bildwandler betrachtet und fokussiert. Das Mikroskop erlaubt außerdem eine Auflichtbeleuchtung für fluoreszenzmikroskopische Arbeiten. Außer der Fluoreszenzmikroskopie mit Anregung bei verschiedenen Erregerwellenlängen ist UV-Fluoreszenz möglich, bei der auch die Sekundärstrahlung im ultravioletten Bereich liegt.

Bei dem Mikrospektrograf der Firma E. Leitz (Bild 6.134) [341] [352] erfolgt die spektrale Zerlegung der Strahlung hinter dem Mikroskop. Der Eintrittsspalt des Spektralapparats liegt am Ort des vom Mikroskopobjektiv erzeugten Bilds. Es können Absorptionsspektren im Bereich von 220 bis 800 nm und Emissionsspektren (Fluoreszenzspektren) registriert werden. Um die Aufnahme eines Absorptionsspektrums quantitativ auszuwerten, wird zusätzlich eine Aufnahme

Bild 6.134. Mikrospektrograf (Gerät in der Mitte) mit Zusatzeinheiten
links: Lampenhaus mit Xenonlampe und Geradsichtmonochromator in Auflichtposition;
rechts: Oszillograf für die Registrierung der Spektren, darunter Versorgungsgerät für den Fotovervielfacher
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto



ohne Objekt, jedoch mit einem rotierenden Sektor hergestellt (Referenzspektrum). Die Registrierung der Spektren kann auch lichtelektrisch erfolgen, wenn in den bildseitigen Strahlengang ein Schwingspiegel eingeschaltet wird, der das Spektrum an einem Austrittsspalt vorbeiführt und somit das spektral zerlegte Licht zeitlich nacheinander einem Fotovervielfacher zuführt. Als Anzeigegerät ist in diesem Fall ein Oszillograf oder ein Schreiber vorgesehen. Schließlich kann das Spektrum auf der Empfängerfläche einer Image-Orthikonkamera abgebildet und von einem Oszillografen in Zeilenwahlschaltung registriert werden. Das Hauptanwendungsgebiet dieser Variante ist die Mikrospektralfluorometrie rasch abklingender Vorgänge im sichtbaren Spektralbereich.

Mikroskope mit lichtelektrischer Fotometrie

In Mikroskopfotometern und Mikrospektralfotometern werden für die lichtelektrische Fotometrie als Strahlungsempfänger fast ausschließlich Fotovervielfacher verwendet [278] [286]. Der dem Strahlungsfluß weitgehend proportionale Fotostrom wird einem Anzeigegerät zugeführt, eventuell über eine elektronische Verstärkung. Das Anzeigegerät ist im einfachsten Fall ein Galvanometer mit linearer Skale für die Messung des Reintransmissionsgrads oder mit einer Extinktionsskale (s. Abschn. 6.1.7.2.). Die registrierenden Anzeigegeräte, z. B. der Kompensationsbandschreiber des VEB Carl Zeiss JENA, arbeiten meist nach dem Kompensationsprinzip. Es gibt Schreiber, die nach Wahl Absorption oder Extinktion registrieren. Zur digitalen Datenerfassung sind Analog-Digital-Wandler mit entsprechenden digitalen Anzeigegeräten oder Speichergeräten gebräuchlich.

Weit verbreitet sind einfache Mikroskopfotometer, die unter Verwendung normaler Mikroskopstative sowie einiger weiterer Zusatzeinheiten auf der Beleuchtungsseite lichtelektrische Fotometrie ermöglichen. Die Meßblende ist entweder fest, variabel oder durch einen Meßblendenrevolver stufenweise wählbar. Da die Objektive nur in der Bildmitte benutzt werden, ist ein ebenes Bildfeld nicht erforderlich. Aufgrund des besseren Farbzustands sind für den sichtbaren Spektralbereich Apochromate zu empfehlen [337]. Eine im Beleuchtungsstrahlengang angeordnete Vorblende wird in die Objektebene abgebildet und dient zur Vermeidung oder Verminderung des SV-Effekts. Zur Abbildung müssen achromatisch-aplanatisch korrigierte Kondensoren verwendet

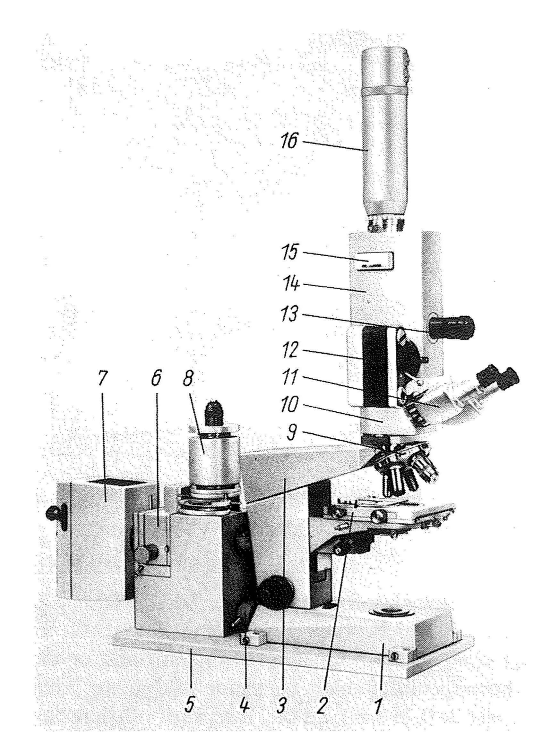


Bild 6.135. AMPLIVAL photometrie
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto
1 Stativ AMPLIVAL; *2* Objekttisch; *3* Träger AMPLIVAL; *4* Durchlichtanpassung; *5* Grundplatte; *6* stellbares Verlauffilter SDVIF; *7* Leuchte 12/100; *8* Leuchte 6/15; *9* zentrierbarer Objektivrevolver; *10* Wechseltubus; *11* binokularer gerader Tubus; *12* mf-Kameraansatz; *13* Einstellsystem; *14* Photometertubus; *15* Meßblendeneinsatz mit stellbarer Meßfeldblende; *16* Meßkopf
Meßverstärker mit Anzeigeinstrument ist nicht dargestellt

werden, die nahezu Objektivqualität haben. Monochromatisches Licht wird meist mit einem Verlaufinterferenzfilter erzeugt. Die Strahlungsquellen müssen gut stabilisiert sein [331] [364]. Mikroskopfotometer dieser einfachen Art werden vorzugsweise für Plug-Messungen eingesetzt. Abschätzungen des Inhomogenitätsfehlers sind bei kleinem Meßfeld (etwa 0,5 μm) durch Punktmessungen möglich. Die Größe der Meßobjekte (z. B. eines Zellkerns) wird durch Fotografie und anschließende Planimetrie ermittelt. Bei geometrisch einfach gestalteten Objekten kann dies auch mit einem Meßschraubenokular erfolgen. Ein Vertreter dieser einfachen Mikroskopfotometer ist das AMPLIVAL photometrie des VEB Carl Zeiss JENA für den sichtbaren Bereich (Bild 6.135) [358].

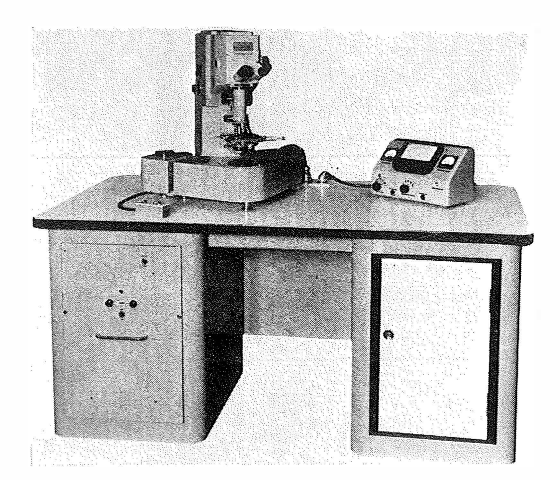


Bild 6.136. Integration Microdensitometer
Firma Barr & Stroud, Werkfoto

Ein Mikroskopfotometer für den sichtbaren Spektralbereich, das durch eine Bildabtastung mit einer mechanischen Scanningeinrichtung den Inhomogenitätsfehler vermeidet (kleinste Meßfeldgröße 0,25 μm), ist das Integration Microdensitometer der Firma Barr & Stroud (Bild 6.136) [266]. Es dient zur Mengenbestimmung von Substanzen in biologischen Objekten, und zwar wird der Farbstoffgehalt stöchiometrisch gefärbter Stoffe innerhalb biologischer Gebilde, z.B. die DNS feulgengefärbter Zellkerne [305], durch Integration ermittelt.
Messung des Integrals Gl. (6.30) mit Objekt und ohne Objekt (Leerstelle), Differenzbildung beider Meßwerte ergeben die Substanzmenge in willkürlichen Einheiten. Mit einem Crushing-Kondensor kann das Objekt zusammengedrückt werden, wodurch ungünstige Einflüsse der Dicke des Objekts auf das Meßergebnis vermieden werden sollen [265]. Das Gerät kann man hinsichtlich seiner Leistung und des technischen Aufwands in eine mittlere Größenklasse einstufen. Als Einstrahlgerät mit Scanningeinrichtung für eine analoge Meßwertanzeige und Beschränkung auf den sichtbaren Spektralbereich erfordert es optisch keinen besonderen Aufwand, dagegen ist der elektronische Aufwand beträchtlich. Es ist besonders für Routinemessungen spezieller Zielstellung geeignet.
Ein typisches Großgerät ist das registrierende Doppelstrahl-Mikrospektralfotometer von *Beckman* (Bild 6. 137). Die Besonderheit des Zweistrahlverfahrens dieses Geräts besteht darin, daß Meß- und Vergleichsstrahlengang das mikroskopische Präparat in enger Nachbarschaft, und zwar in wählbarem Abstand, durchdringen, während im Universal-Mikrospektralfotometer UMSP I von Opton der Meßstrahlengang vom Vergleichsstrahlengang räumlich getrennt ist. Ein Schwingspiegel läßt das Bild einer variabel einstellbaren Meßblende über das Objekt derart hin- und herwandern, daß der eine Umkehrpunkt mit der Objektfeldmitte zusammenfällt (Meßstrahl) und der andere Umkehrpunkt durch eine Vergleichsstelle in dessen Nachbarschaft hindurchgeht (Vergleichsstrahl). Die Drehschwingung des Schwingspiegels ist mit einer Unterbrecherblende gekoppelt, so daß nur in den Umkehrpunkten der

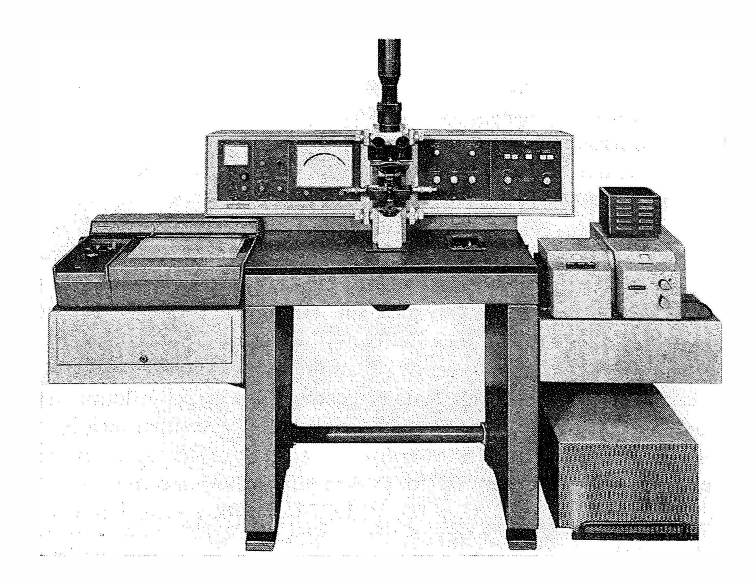


Bild 6.137. Registrierendes Doppelstrahl-Mikrospektralfotometer MS 1206 von Beckman
Werkfoto

Lichtdurchtritt freigegeben wird. Bei der Scanningeinrichtung wird der Schwingspiegel benutzt, um die Zeilenabtastung vorzunehmen (x-Richtung), während der Vorschub in y-Richtung durch Bewegung des Tisches mit Schrittmotor erfolgt. Das Gerät arbeitet dann nach dem Einstrahlprinzip. Maximale Scanningfläche: 50 μm × 50 μm. Scanninggeschwindigkeit: 6,25 Zeilen/s. Der Anschluß eines digitalen Datenerfassungssystems über einen Analogwandler ist möglich.

Ein Laborgerät unter Ausnutzung kommerzieller Baueinheiten ist das Ultraviolett-Mikrospektralfotometer für Messungen mit polarisiertem Licht, das von *Wetzel* und Mitarbeiter [366] entwickelt wurde. Durch Registrierung von UV-Absorptionsspektren ermöglicht das Gerät vor allem die Messung von linearem Dichroismus im UV [365].

6.1.7.4. Anwendungen

Das Hauptanwendungsgebiet der Mikroskopfotometrie und Mikrospektralfotometrie sind Biologie und Medizin, vor allem die Zytologie und Histologie. Die Methodik erlaubt qualitative und quantitative Zellchemie durch Identifikationen und Mengenbestimmungen. Durch statistische Auswertung der Messungen an Zellen können die Wirkungen der verschiedensten Einflußparameter (z.B. Chemotherapeutika) untersucht werden. Ein wichtiges Spezialgebiet ist die Krebsforschung, wobei eine auf diese Belange spezialisierte Methodik Aussicht auf routinemäßigen Einsatz in der Krebsdiagnose erwarten läßt [363].

In der Industrie dürfte die Anwendung von hochauflösenden Mikroskopfotometern für die Mikroelektronik eine wesentliche Bedeutung haben. In der Textilindustrie sind mikrofotometrische Messungen z.B. für die Faserforschung wichtig [292].

Die Bedeutung der Mikrofotometrie und Mikrospektralfotometrie im Bereich der Biologie und Medizin beruht darauf, daß wichtige Zellsubstanzen im UV absorbieren oder daß es gelingt, stöchiometrische Farbreaktionen an diesen Substanzen durchzuführen und damit die Absorption in das sichtbare Gebiet zu verlagern.

Im folgenden werden die Stoffe angegeben, die vornehmlich im UV absorbieren (Bild 6.138). Von großer Bedeutung ist die UV-Absorption der Nukleinsäuren, und zwar der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und der Ribonukleinsäure (RNS), deren Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Eine Unterscheidung beider Nukleinsäuren ist UV-spektralfotometrisch nicht möglich, kann jedoch durch fermentative Behandlung erfolgen, und zwar durch Entfernung der RNS durch Ribonuklease. Im UV absorbieren ferner Proteine, die aromatische Aminosäuren enthalten. Dazu gehören vor allem Tyrosin (Oxyphenylalanin) und Tryptophan, während das Phenylalanin relativ schwach absorbiert. Das Absorptionsmaximum von Tryptophan liegt bei 280 nm, beim Tyrosin

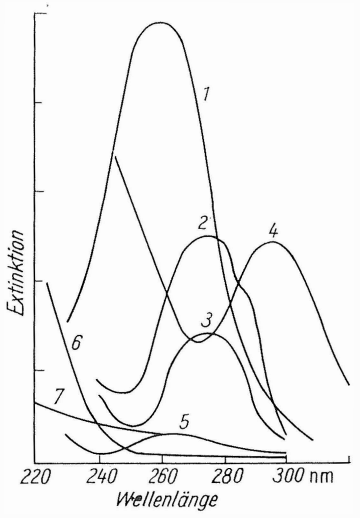


Bild 6.138. Schematische Absorptionskurven der wichtigsten, im UV absorbierenden Zellbestandteile
1 Nukleinsäure; *2* Tryptophan; *3* Tyrosin, sauer; *4* Tyrosin, alkalisch; *5* Phenylalanin; *6* aliphatische Aminosäuren; *7* unspezifische Absorption (Lichtstreuung); (nach Sandritter)

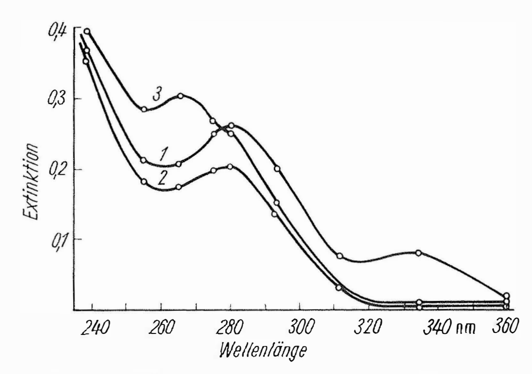


Bild 6.139. Wiedergabe einiger typischer UV-mikrospektrografischer Absorptionskurven, gemessen in der Schilddrüse der Ratte nach Gefriertrocknung
1 Schilddrüsenkolloid (Absorption durch Protein und Thyreoglobulin); *2* Cytoplasma einer parafollikulären Zelle (typische Proteinabsorption); *3* Cytoplasma einer Follikelzelle (Absorption durch Nukleinsäure und Protein) nach Sandritter

schwankt es je nach pH-Wert zwischen 275 und 295 nm. Die tryptophan- und tyrosinhaltigen Eiweißkörper treten vorwiegend im Zellplasma und im Zellkern auf. Im Bindegewebe sind kaum aromatische Aminosäuren vorhanden. Im Bild 6.139 werden typische UV-mikrospektrografische Absorptionskurven gezeigt, die durch Protein- bzw. Nukleinsäureabsorption bedingt sind. Im Bild 6.140 ist ein Beispiel gegeben, wie durch fotografische Fotometrie des UV-Absorptionsbilds die mikroelektrophoretisch getrennten Bausteine der Nukleinsäuren (Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil) mengenmäßig bestimmt werden können. Neben diesen wichtigen Substanzen gibt es noch eine Reihe weiterer UV-absorbierender Substanzen, auf die hier nur hingewiesen werden kann (Lipofuscin, Melanin, Häminpigmente, Ascorbinsäure, Muskeladenylsäure, Harnsäure, Barbitursäure u.a.).

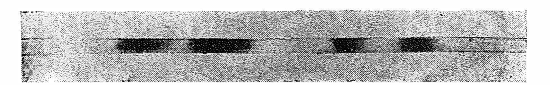


Bild 6.140. Mikroelektrophoretische Mengenbestimmung durch Anwendung der fotografischen Fotometrie, entnommen aus Edström [270]

Die meisten Anfärbungen, die in der Histologie üblich sind, sind für quantitative Untersuchungen nicht geeignet, weil sie nicht stöchiometrisch erfolgen. Jedoch gibt es eine Reihe von Farbreaktionen, die den quantitativen Forderungen weitgehend genügen. Am bekanntesten ist die DNS-spezifische Feulgenreaktion [305]. Ferner ist die Gallocyanin-Chromalaun-Färbung für die Nukleinsäuren quantitativ verwertbar. Weitere Beispiele sind: Histon mit Fastgreen, Tyrosin durch die Millonsche Reaktion, Arginin nach *Sakaguchi* u.a. Zur weiteren Information und Einarbeitung in das Gebiet der Mikroskopfotometrie und Mikrospektralfotometrie hinsichtlich Methodik und Anwendung wird auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen, z.B. *Casperson* [262], *Sandritter* [342], *Swift* und *Rasch* [351], *Walker* [359], *Kiefer* und *Sandritter* [293], *Brodski* [260], *Wied* u.a. [367] [369], *Neuhoff* u.a. [322].

6.1.8. Kernspurmikroskopie

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

Der Nachweis korpuskularer ionisierender Strahlen in Fotoemulsionen ist fast so alt wie die Fotoplatte selbst. Denn schon im Jahre 1896 stellte *Becquerel* fest, daß Fotoplatten durch Uranmineralien geschwärzt werden, und hatte damit die radioaktive Strahlung entdeckt. Zunächst hat jedoch die im Prinzip recht einfache Methode des Nachweises der radioaktiven Strahlung und des sie verursachenden Atomzerfalls durch Fotoemulsionen wenig Verbreitung gefunden.

Einen wesentlichen Fortschritt in der Kernspuremulsionstechnik erzielten *Blau* und *Wambacher* durch ihre Arbeiten zur Verbesserung der Fotoemulsionen und ihrer Sensibilisierung für schnelle Protonen [376] [377] [378].

Es konnte gezeigt werden, daß zur Erzielung gut auswertbarer Bahnspuren Emulsionen mit viel dichterer und feinerer Körnung des Silberbromids erforderlich sind.

Mit Hilfe der kosmischen Strahlung war es möglich, die verbesserten Emulsionen mit hochenergetischen Elementarteilchen zu bestrahlen. Zur Steigerung der Primärintensität ist man dazu übergegangen, die Kernspuremulsion in größeren Höhen, z.B. auf hohen Bergen, mehrere Wochen oder Monate lang der Strahlung auszusetzen. Außerdem wurden große Ballonexpeditionen durchgeführt, bei denen größere Emulsionspakete, aufeinandergelegte Emulsionsschichten ohne Glasträger, in Höhen bis zu 30 km exponiert wurden. Erst hinterher werden die Emulsionsschichten auf Glasträger aufgezogen, entwickelt und ausgewertet. Heute können im Rahmen der Raketentechnik noch wesentlich größere Höhen erreicht werden. So erhält man in jedem Emulsionspaket eine große Anzahl sog. Sterne, deren Arme die Bahnspuren elektrisch geladener Elementarteilchen darstellen, die beim Zerfall der in der Emulsion enthaltenen Atomkerne entstehen. Da der Durchmesser der in der Emulsion enthaltenen Silberkörner erheblich unter 1 μm liegt und diese, je nach Energie des Teilchens und Betrag der elektrischen Ladung, mehr oder weniger dicht aneinandergereiht sind, ist die Auswertung solcher Kernreaktionen, die zu wichtigen Erkenntnissen über den Aufbau des Atomkerns geführt haben, nur mit einem Mikroskop höchster Auflösung möglich.

Zum Bestimmen der Energieverteilung von Neutronen, z.B. in einem Reaktor, ist die Fotoplatte ebenfalls gut geeignet. Obwohl die ungeladenen Neutronen selbst nicht in der Lage sind, die Fotoemulsionen zu schwärzen, kann durch Sekundärreaktionen, z.B. Rückstoßprotonen, der Durchgang der Neutronen durch die Emulsion quantitativ erfaßt werden.

Ihre Anzahl ist ein Maß für die eingestrahlte Neutronenintensität. Aus den Spurlängen ergibt sich die Energieverteilung.

Eine andere Methode besteht darin, in die Emulsion ein Element (Lithium oder Beryllium) einzubauen, das durch Bestrahlung mit Neutronen umgewandelt wird. Von jedem getroffenen Lithium- oder Berylliumkern gehen zwei bzw. drei kurze Spuren ungleicher Länge aus. Die Anzahl der Reaktionen ist ein Maß für die eingefallene Neutronenintensität. Die Spurlänge ist aber in diesem Fall kein Maß für die Energie der eingefallenen Neutronen, da sie eindeutig durch den Reaktionstyp festgelegt ist.

Als einer der Pioniere für die Entwicklung der Kernspuremulsionstechnik kann *C. F. Powell* angesehen werden, der neben der kosmischen Strahlung zur Bestrahlung der Emulsionen auch die neu entwickelten Teilchenbeschleuniger einsetzte [388] [389] und für seine mit Kernspuremulsionen durchgeführten kernphysikalischen Untersuchungen den Nobelpreis für Physik erhielt. Inzwischen sind die Leistungen der Teilchenbeschleuniger erheblich gesteigert und die Kernspuremulsionen weiter verbessert worden, so daß heute alle geladenen Teilchen registriert werden können.

Wenn auch die Kernspuremulsionen seit Einführung der Blasenkammer an Bedeutung verloren haben, so bleiben sie doch auch in Zukunft ein wichtiges Hilfsmittel der experimentellen Kernphysik.

Wenn ein elektrisch geladenes Teilchen, etwa ein Atomkern oder ein Elektron, eine Emulsion geeigneter Empfindlichkeit passiert, kann die Bahn dieses Teilchens durch Entwickeln der Emulsion sichtbar gemacht werden. Die Bahnspur besteht, je nach Geschwindigkeit und Ladung des Teilchens, aus einer Reihe mehr oder weniger dicht aneinandergereihter geschwärzter Silberkörner (Bilder 6.141 und 6.142a bis c). Die Spur erbringt also zunächst den Nachweis, daß ein geladenes Teilchen in die Emulsion eingedrungen und, wenn sie die gesamte Schicht durchsetzt, auch wieder aus der Emulsion ausgetreten ist. Durch eine genaue Analyse der Spur lassen sich darüber hinaus Angaben über Art und Geschwindigkeit und damit auch über die Energie des Teilchens machen.

Beim Auftreffen eines schnellen Teilchens auf einen Atomkern der Emulsion wird häufig der ganze Kernverband gesprengt. Bei geladenen Teilchen erzeugt außer dem Primärteilchen auch jedes Sekundärteilchen in der Emulsion eine Spur.

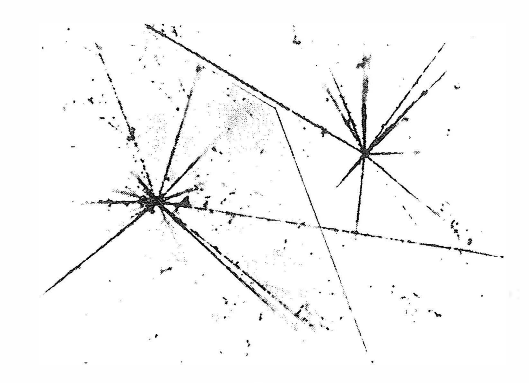


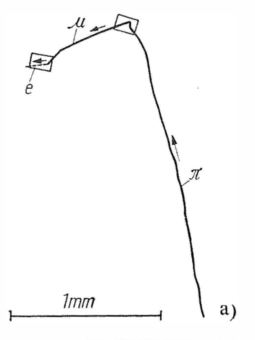
Bild 6.141. Zwei schnelle Teilchen haben dicht beieinander je einen Atomkern getroffen. Letztere sind in einige Bruchstücke zerfallen; die elektrisch geladenen haben sichtbare Spuren hinterlassen, die einen sog. Stern bilden. Das Bild ist aus zwei Aufnahmen zusammengesetzt, da ein geringer Tiefenunterschied zwischen den Zentren der Sterne vorhanden war.
M 400 : 1 [375]

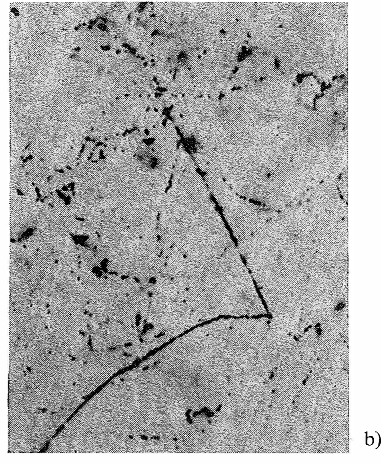
Man sieht also nach der Entwicklung von einem Punkt strahlenartig ausgehende Spuren und bezeichnet die ganze Erscheinung als einen Stern (Bild 6.141). Die Aufgabe der Kernspurmeßtechnik besteht darin, den in diesen Sternen (bzw. Einzelspuren) registrierten Informationsgehalt über die Kernprozesse (bzw. Einzelteilchen) möglichst restlos auszuwerten und daraus Rückschlüsse auf die Eigenschaften der Atomkerne und anderer Elementarteilchen und deren Wechselwirkung zu ziehen. Dazu gehört auch die Erforschung der Primärstrahlung, z. B. der kosmischen Strahlung.

Man kann aus einem zufälligen Ereignis keine Theorie über den Aufbau der Atomkerne aufstellen. Dafür ist sehr umfangreiches Untersuchungsmaterial erforderlich. Es müssen viele Kernumwandlungen studiert werden, um möglichst sichere Schlüsse ziehen zu können. Dazu sind einmal Mittel erforderlich, um Kernumwandlungen der gewünschten Art in genügender Anzahl zu erzeugen, und zum anderen Mittel, diese mit genügender Sicherheit und möglichst rationell auszuwerten.

Es stehen je nach Verfahren folgende Meßgrößen zur Verfügung:

1. die Korndichte bei nicht zu dichten Spuren,
2. die Lückendichte oder Schwärzung bei dichteren Spuren,
3. die δ-Strahldichte bei Spuren mehrfach geladener Teilchen (δ-Strahlen sind die Spuren von Sekundärelektronen),





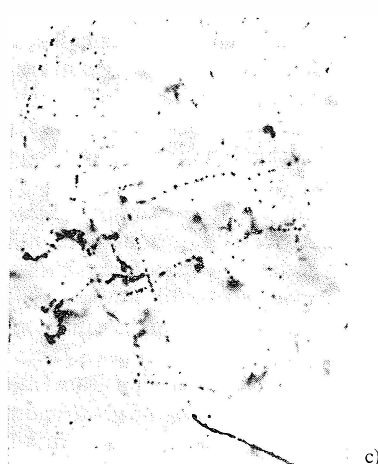


Bild 6.142. Darstellung eines Mesonenzerfalls

a) ($\pi \to \mu \to e$) Ein von außen eingedrungenes π-Meson ist in der Emulsion zur Ruhe gekommen und dabei in ein μ-Meson und ein ungeladenes Teilchen zerfallen. Der gesamte Vorgang ist räumlich so weit ausgedehnt, daß es nicht möglich ist, ihn hier mikrofotografisch darzustellen. Es werden deshalb nur die Mikrofotografien wiedergegeben, die die Knickpunkte enthalten. Der durch sie überdeckte Bereich ist in der Zeichnung angedeutet;
b) $\pi \to \mu$-Zerfall; M 550 : 1;
c) $\mu \to e$-Zerfall; M 550 : 1 [375]

4. die Reichweite bei Spuren, die in der Emulsion enden,
5. der Krümmungsradius der Spuren in Platten, die in einem starken Magnetfeld exponiert wurden,
6. der mittlere Winkel der Vielfachstreuung (Coulomb-Streuung),
7. die Winkelverteilung der einzelnen Spuren bei Sternen und anderen Zerfällen.

Es lassen sich Beziehungen zwischen den gemessenen Größen und den Teilcheneigenschaften, wie Ladung, Masse und Geschwindigkeit, aufstellen. Da in überwiegender Anzahl einfach geladene Teilchen auftreten und mehrfach geladene aufgrund des Aussehens der Spur (z. B. δ-Strahlen) meist leicht unterschieden werden können, bleiben als unbekannte Größen nur noch Masse und Geschwindigkeit. Zum Ermitteln der zwei Unbekannten braucht man zwei voneinander unabhängige Beziehungen, d. h., zur Teilchenidentifikation sind zwei voneinander unabhängige Messungen erforderlich.
Es wurden bisher vorzugsweise folgende Kombinationen verwendet:

1. Reichweite–Korndichte (Lückendichte)
2. Reichweite–Vielfachstreuung
3. Reichweite–Bahnkrümmung
4. Korndichte–Vielfachstreuung.

Diese sind aber nur beschränkt anwendbar. Die Reichweite kann nur bestimmt werden, wenn das Teilchen durch Abbremsen in der Emulsion zur Ruhe kommt, und das ist nur bei relativ langsamen Teilchen der Fall. Die Korndichte kann zur Teilchenidentifikation nur für nicht zu hohe Geschwindigkeiten herangezogen werden. Die Bahnkrümmung im Magnetfeld erreicht bei hohen Teilchenenergien, selbst bei Verwendung eines idealen Meßmikroskops, nur dann einen meßbaren Betrag, wenn man extrem starke Magnetfelder verwendet, wie sie bis jetzt nicht zur Verfügung stehen.
Die Bestimmung der Reichweite, Korndichte und Bahnkrümmung ist also nur bei relativ geringen Teilchenenergien anwendbar. Doch gerade die Teilchen hoher Energie ($> 10^8$ eV) sind von ganz besonderem Interesse.
Zum Aufstellen einer Energiebilanz bei hochenergetischen Prozessen steht deshalb in erster Linie die Vielfachstreuung zur Verfügung, die ein direktes Maß für die Energie des Teilchens ist. Für sehr hochenergetische Primärteilchen, die einen sog. Mesonenschauer erzeugen, sind die

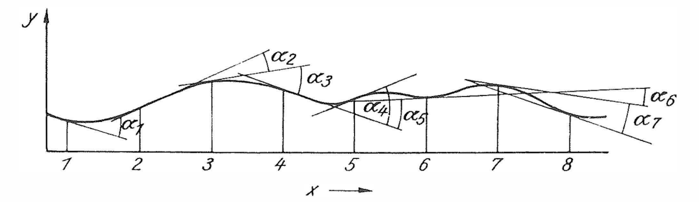


Bild 6.143. Bestimmung des mittleren Winkels der Vielfachstreuung [375]

Anzahl der Sekundärspuren und ihre Winkelverteilung die wichtigsten Größen. Es zeigt sich, daß in der Methodik und hinsichtlich der vom Mikroskop zu fordernden Qualität zu unterscheiden ist zwischen den Teilchen geringerer und denen hoher Energie, ferner zwischen Mikroskopen zum Aufsuchen von Kernreaktionen und solchen zur Vermessung derselben.

Bei den geringen Energien (z.B. der Neutronenphysik) sind die an die mikroskopische Ausrüstung zu stellenden Forderungen am geringsten. Da man wegen der kleinen Spurlänge mit einer Emulsionsdicke < 100 μm auskommt und auch keine großen Plattenformate notwendig sind, können zum Messen die mit normalen hochauflösenden Immersionsobjektiven ausgestatteten handelsüblichen Durchlichtmikroskope verwendet werden, deren Ausrüstung lediglich dem besonderen Verwendungszweck anzupassen ist. Gemessen werden vor allem Strecken und Winkel. Sind die Spuren nicht länger als ein Dingfelddurchmesser, dann können die Spurlängen direkt im Dingfeld, z.B. mit einem Meßschraubenokular, und die Winkel mit einem Goniometerokular gemessen werden. Einige Schwierigkeiten bestehen bei stark geneigten Spuren, bei denen auch eine genaue Tiefenmessung erforderlich ist.

Bei der so durchgeführten Neutronenspektroskopie sind für eine ausreichende Statistik sehr viele Einzelmessungen durchzuführen, und eine weitreichende Mechanisierung der Messungen sowie automatische Registrierung und Auswertung der Meßwerte werden zur Notwendigkeit.

Bei der Untersuchung von Kernreaktionen und Teilchen hoher Energie ist die Situation eine ganz andere. Hier läßt sich mit normalen Mikroskopen kaum etwas anfangen. Die Schwierigkeiten beginnen schon bei der Emulsionsdicke, die aus meßtechnischen Gründen in diesem Fall möglichst groß sein muß, damit die Spurlänge in jeder Emulsionsschicht möglichst groß wird. Die Emulsionsdicke beträgt nach dem Entwickeln 300 bis 400 μm. Darauf kommt meist noch eine Finderfolie, so daß die Gesamtdicke bis zu 500 μm beträgt. Da die modernen Kernspuremulsionen äußerst feinkörnig sind (etwa 0,1 bis 0,6 μm Korndmr.), können genaue Messungen nur mit gut korrigierten Objektiven stärkster Apertur durchgeführt werden. Solche Forderungen (Apertur > 1,3 bei einem Arbeitsabstand > 500 μm) werden an ein normales Objektiv nicht gestellt, so daß für die Kernspurmikroskopie spezielle Objektive berechnet werden mußten.

Der zweite, nicht weniger bedeutsame Gesichtspunkt besteht darin, daß die Streumessungen an Spuren hochenergetischer Teilchen nur zu einer brauchbaren Aussage führen, wenn die Bahnspuren lang genug sind. Ihre Länge beträgt bis zu 50 mm. Die obere Energiegrenze, für die solche Streumessungen noch sinnvoll sind, hängt von verschiedenen Faktoren, vor allem von der Güte des Meßmikroskops ab. Da die Kernspur dabei über viele Dingfelder hinweg bewegt werden muß, ist das vor allem eine Frage der Präzision der Tischbewegung. Deshalb sind spezielle Streumeßmikroskope entwickelt worden, die z.T. die Grenze des Möglichen praktisch erreicht haben.

Mit einem ausgezeichneten Gerät sollte man Bahnspuren von Teilchen mit einer Energie von 10^{10} bis 10^{11} eV noch sinnvoll vermessen können. Die linearen Abweichungen der Teilchenbahnen von einer Geraden liegen dann allerdings bei 0,1 μm und darunter, so daß eine Meßgenauigkeit von einigen hundertstel Mikrometern garantiert sein muß.

Zur Erläuterung des Streumeßverfahrens wollen wir zunächst der Einfachheit halber annehmen, daß die Spur in der Emulsion ein getreues Abbild der Teilchenbahn ist (Bild 6.143).

Die Spur wird zunächst möglichst parallel einer bevorzugten Richtung (der x-Richtung) gelegt; die dazu senkrechte Richtung in der Plattenebene sei dann die y-Richtung. Man beschränkt sich bei Streumessungen meist auf die x,y-Ebene, bei geneigten Spuren denkt man sich diese in eine Ebene senkrecht zur optischen Achse projiziert und dort die Messungen vorgenommen. Die x-Achse wird in vorher festgelegte Intervalle eingeteilt, die vorzugsweise konstant sind. Wir nennen diese Intervalle Zellen und bezeichnen ihre Länge mit dem Buchstaben t in Einheiten von 100 μm. Im Bild 6.143 sind die Zellgrenzen durch die Ziffern

1 bis 8 bezeichnet. Zunächst wird für jede Zelle der Winkel zwischen den bei den Zellgrenzen an die Spur angelegten Tangenten, also die Winkel α_1, α_2, α_3 usw., bestimmt und als mittlerer Streuwinkel der Mittelwert

$$\bar{\alpha}_T = \frac{1}{n} \sum_1^n |\alpha_i| \qquad (6.43)$$

berechnet. Der Index T soll an die Tangente erinnern. Für diesen mittleren Winkel der Vielfachstreuung gilt die Gleichung

$$\bar{\alpha}_T = \frac{Kz\sqrt{t}}{pv}. \qquad (6.44)$$

K ist die Streukonstante, die im wesentlichen von den Eigenschaften der Emulsion abhängt und für jede Emulsion mit Eichspuren experimentell bestimmt werden muß; z, p, v sind Ladung, Impuls und Geschwindigkeit des Teilchens. Man sieht aus Gl. (6.44), daß der mittlere Streuwinkel der kinetischen Energie umgekehrt proportional ist.

Die Ermittlung der Einzelwinkel α_1, α_2, α_3 usw. kann durch Differenzbildung der Tangentenwinkel, wie im Bild 6.143, erfolgen. Bei hohen Energien ist es jedoch aus verschiedenen Gründen besser, nach der sog. Sagitta-Methode zu arbeiten. Bei dieser werden in Abständen der Zellenlänge t die Ordinaten y der Spur bestimmt und daraus die zweiten Differenzen gebildet. Für die i-te zweite Differenz erhält man nach Bild 6.144

$$D_i = (y_i - y_{i+1}) - (y_{i+1} - y_{i+2})$$
$$= y_i - 2y_{i+1} + y_{i+2} \qquad (6.45)$$

und daraus den mittleren Streuwinkel

$$\bar{\alpha}_S = \frac{\bar{D}}{t} \quad \text{mit} \quad \bar{D} = \frac{1}{n} \sum_1^n |D_i|.$$

Der Index S weist darauf hin, daß es sich in diesem Fall um Sekantenwinkel handelt. Die Winkel α_T und α_S sind nicht identisch. Die Sagitta-Methode erfordert zwar mehr Rechenarbeit als die Winkelmethode; es sind aber nur Längenmessungen durchzuführen, so daß mit den heute zur Verfügung stehenden Mitteln eine höhere Genauigkeit erreicht wird.

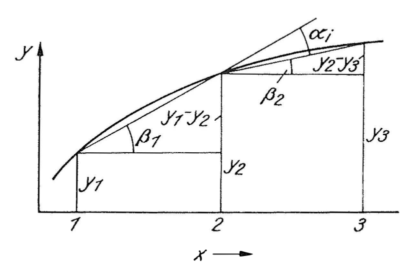


Bild 6.144. Sagittamethode [375]

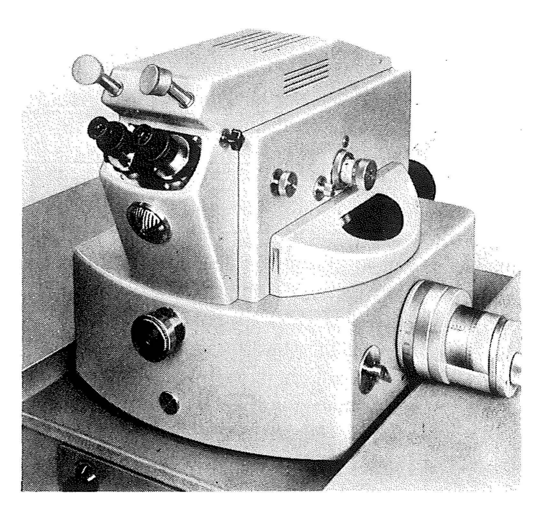


Bild 6.145. Kernspurmeßmikroskop KSM
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Von den kommerziell hergestellten Streumeßmikroskopen seien genannt das SM2 der Firma Koristka, Milano [379], das mit einem speziellen Streumeßtisch mit Führungslineal zum Streumeßmikroskop ausgebaute Ortholux von Leitz, Wetzlar, sowie das Kernspurmeßmikroskop KSM vom VEB Carl Zeiss JENA (Bild 6.145) [375].

Bei diesen Geräten wurde größter Wert darauf gelegt, die unregelmäßigen Abweichungen von der Geradlinigkeit der Tischbewegung (die Krümmung im Kleinen) oder das sog. Tischrauschen möglichst klein zu halten, da dieses in erster Linie die Meßgenauigkeit begrenzt. Als Maß für das Tischrauschen benutzt man den Wert

$$\bar{D} = \frac{1}{n} \sum_1^n D_i,$$

der wie für die Berechnung des mittleren Streuwinkels gebildet wird. Er hängt von der Zellenlänge ab und liegt beim KSM für den Zellenlängenbereich von 100 bis 1000 μm in der Größenordnung von 0,002 bis 0,005 μm. Neben den unumgänglichen Genauigkeitsforderungen, besonders hinsichtlich der Tisch- und Objektivführung, ist auch der Bedienungskomfort ein wesentliches Merkmal eines guten Streumeßmikroskops, weil die durchzuführenden Messungen langwierig sind und stets ein umfangreiches Untersuchungsmaterial ausgewertet werden muß.

Im Zuge der weiteren Rationalisierung und Automatisierung werden die Meßwerte heute vielfach direkt auf Lochstreifen registriert und mit einem Elektronenrechner nach einem bestimmten Programm ausgewertet.
Außerdem sind auch Ansätze vorhanden, das zeitraubende Durchmustern der exponierten und entwickelten Kernspuremulsion auf Kernprozesse zu automatisieren; denn nur so ist es möglich, die mit den Fotoemulsionen gegenüber der Blasenkammer verbundenen Vorteile zur Geltung zu bringen.

6.1.9. Hinweise zur Präpariertechnik

von Dr. rer. nat. *Ludwig Otto*

6.1.9.1. Allgemeine Grundlagen

Der Gegenstand mikroskopischer Untersuchungen ist in den wenigsten Fällen im nativen Zustand der Beobachtung zugänglich. Er muß i. allg. durch zielgerichtete Maßnahmen zum mikroskopischen Präparat geformt werden.
Die anwachsende Anzahl der mikroskopischen Beobachtungs- und Meßmethoden vergrößert zwangsläufig auch die Anzahl der Präparierverfahren und ihrer Varianten in einem Umfang, daß eine intensive Abhandlung dieses vielverzweigten Gebiets den Rahmen dieses Handbuchs sprengen würde. Es sollen deshalb hier nur die wichtigsten Voraussetzungen erläutert und auf die verbreitetsten Bücher der mikroskopischen Präpariertechnik verwiesen werden [224] [391] [394] bis [396] [399] [408] [412] [417]. Monografien über die einzelnen Beobachtungsverfahren [403] [420] [422] [423] bringen i. allg. um so eingehendere Hinweise zur Präparationstechnik, je schärfere Forderungen das Verfahren selbst an das Präparat stellt.
Aus allem, was in diesem Zusammenhang über das optische Vermögen des Mikroskops und seine Abbildungseigenschaften gesagt wird, geht klar hervor, daß das Mikroskop sehr empfindlich auf Eingriffe in seinen Strahlengang reagiert. Das Präparat liegt mit allen seinen Teilen im Beobachtungsstrahlengang, es ist also zu erwarten, daß unangemessene oder fehlerhafte Präpariertechnik Abbildungsstörungen zeitigt, die das Untersuchungsergebnis in Frage stellen können.
Je komplizierter und optisch anspruchsvoller das Beobachtungsverfahren ist, desto höher sind die Forderungen, die es an die Präpariertechnik und das dabei benutzte Material stellt.

Das beginnt bereits beim Objektträger, der im Beleuchtungsstrahlengang liegt und dessen Eigenschaften vor allem bei optisch empfindlichen Verfahren, z. B. Phasenkontrast, Dunkelfeld und Interferenzmikroskopie, eine starke Wirkung zukommt.
Praktisch wichtigstes Maß des Objektträgers für alle Verfahren ist seine Dicke. Das gilt nicht nur für die Dunkelfeldbeleuchtung (s. Abschnitt 6.1.2.), bei der das Gelingen der Untersuchung stark von der Objektträgerdicke beeinflußt wird [409], sondern für alle mikroskopischen Arbeiten, für die reproduzierbare Beleuchtungsbedingungen erforderlich oder wünschenswert sind.
Die Objektträgerdicke soll so bemessen sein, daß Schnittweite und Verstellbereich des Kondensors die Abbildung der Leuchtfeldblende oder der Lichtquelle in die Objektebene erlauben. Diese fällt in der Untersuchungspraxis meist mit der Objektträgeroberseite zusammen, denn die Präparation auf dem Deckglas wird man im Hinblick auf die Ökonomie der Zeit zu vermeiden suchen, soweit das zulässig ist. Doch auch in diesem Fall spielt die Objektträgerdicke im Zusammenwirken mit der Schnittweite des Kondensors eine entscheidende Rolle bei der Einstellung reproduzierbarer Beleuchtungsverfahren. Der Praktiker sollte deshalb darauf achten, nur Objektträger zu verwenden, die die Forderungen der TGL 18987 Objektträger für Mikropräparate oder GOST 9184-5 erfüllen. Ob eine im Handel angebotene Objektträgersorte diesen Bedingungen genügt, geht aus der Beschriftung der Verpackung hervor.
Die Abmessungen von Objektträgern nach TGL 18987 sind folgende:

Sortierung nach Dicke mm A	B	Breite mm ± 0,5	Länge mm ± 0,5 L
1 ± 0,1	1 + 0,3 − 0,1	26	48
			76
		49	49
		52	76

Bei Arbeiten mit kritischen Farbreaktionen oder Mikrofotografie auf Farbfilm sollte man darauf achten, Objektträger aus möglichst farblosem Glas zu verwenden.

Die Objektträgerdicke ist wichtig bei Arbeiten mit Kondensoren hoher Apertur und damit geringer Schnittweite. Liegt die Oberseite des Objektträgers und damit die Objektebene zu hoch, ist die für das Köhlerverfahren erforderliche scharfe Abbildung der Leuchtfeldblende nicht möglich.

Das gilt auch bei Verwendung des Dunkelfeldverfahrens mit Immersionskondensoren (s. Abschnitt 6.1.2.). Gleichmäßige und gute Dunkelfeldbeleuchtung ist nur dann möglich, wenn die Strahlenvereinigung des beleuchtenden Bündels möglichst genau in der Objektebene liegt [409].

Obwohl für das Phasenkontrastverfahren i. allg. keine Immersionskondensoren benutzt werden, sollte man im Interesse guter Ringblendenabbildung (s. Abschn. 6.1.2.) auf die Verwendung von Objektträgern nach TGL 18987 achten.

Zu Beobachtungen lebender Objekte in Kammern, für die sich das Phasenkontrastverfahren anbietet, sollen nur Kammern mit parallelen Boden- und Deckflächen benutzt werden. Die Objektträger mit runden Einschliffen, die gelegentlich zur Beobachtung lebender Objekte im Hellfeld benutzt werden, sind für Phasenkontrastbeobachtungen ungeeignet. Der eingeschliffene Bezirk bildet eine plankonkave Linse mangelhaft definierter optischer Eigenschaften, die die Abbildung der Ringblende in die hintere Brennebene des Objektivs stört.

Die Fluoreszenzmikroskopie stellt an die geometrischen Abmessungen der Objektträger keine außergewöhnlichen Anforderungen. Hier ist die Freiheit von Autofluoreszenz die Bedingung mit Vorrang. Echte Autofluoreszenz ist hierbei sehr selten, der Grund für störende Fluoreszenzerscheinungen sollte deshalb in Verunreinigungen gesucht werden. Reinigung mit Chromschwefelsäure schafft meistens Abhilfe.

Für Zwecke der Polarisationsmikroskopie können nur Objektträger benutzt werden, die frei von Spannungsdoppelbrechung und doppelbrechenden Einschlüssen sind. Die Prüfung erfolgt unter dem Polarisationsmikroskop zwischen gekreuzten Polaren (s. Abschn. 6.1.4.).

Die Interferenzmikroskopie stellt an die Qualität der Objektträger die gleichen Anforderungen wie das Phasenkontrastverfahren.

Da Staub doppelbrechend sein oder fluoreszieren kann, im Dunkelfeld Objekte vortäuscht und auch im Hellfeld und unter dem Interferenzmikroskop stört, sollte man nur staubfreie Objektträger benutzen. Einmal gereinigte Objektträger halten sich in einem verschlossenen Gefäß in Alkohol-Äther staubfrei.

Im Zusammenhang mit Objektträgern muß noch auf folgendes hingewiesen werden:

Handelsübliche Objektträger mit geschnittenen Kanten, die aus Wirtschaftlichkeitsgründen meist verwendet werden, sondern bei schneller und intensiver Routinearbeit Glasstaub ab, der sich im Innern der beweglichen Objekttische (Kreuztische) absetzt. Dieser mechanisch sehr aggressive Staub ist regelmäßig zu entfernen, um die Funktionsdauer der Kreuztischantriebe und -führungen zu erhöhen.

Tafel 6.8. Deckgläser nach TGL 18988

Sorte A Dicke S	Sorte B Dicke S	b ± 0,5	l ± 0,5	zulässiger Dickenunterschied (Keilfehler)
0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,02	12	24	0,03
		18	18	
		20	20	
		20	26	
		24	24	
		24	32	
		24	40	
		24	50	
		24	60	
		40	40	
		40	60	
		50	70	
		55	85	

Deckgläser (Tafel 6.8) im abbildenden Strahlengang, ihre Dicke, Brechzahl und Dispersion werden bei der Konstruktion der Objektive berücksichtigt.

Die für ein bestimmtes Objektiv zulässige Deckglasdicke ist auf dem Mantel aufgraviert (s. Abschn. 2.5.1.6.). Die praktische Präpariertechnik soll anstreben, die Deckglasdicke bei Präparaten, die mit Einschlußmassen, z. B. Glyzeringelatine oder Balsam, hergestellt werden, möglichst gering zu wählen, vor allem, wenn Beobachtungen mit Immersions- oder Trockenobjektiven > 0,60 Apertur erforderlich werden. Da nur in den seltensten Fällen Objekte auf Deckgläsern montiert werden, kommt die Dicke des Einschlußmittels zwischen Objekt und Deckglas in ihrer optischen Wirkung zur Deckglasdicke hinzu, die effektive Deckglasdicke vergrößert sich und es besteht die Gefahr merklicher

Beeinträchtigung der sphärischen Korrektion des Objektivs [392] [393] [402] [404] [414] [418] [419] [421]. Beim Herstellen von Präparaten, die mit starken Objektiven hoher Korrektion beobachtet werden sollen, empfiehlt sich deshalb, nach dem Eindecken ein Gewicht auf das Deckglas zu stellen, dessen Eigenmasse überschüssiges Einschlußmedium eliminiert. Auf gleichmäßigen Druck über die ganze Objektträgerfläche ist zu achten, denn punktförmiger Druck kann das Deckglas durchbiegen und das Objekt beschädigen. Eigene Untersuchungen zeigten, daß die Belastung einer Kreisfläche von Dmr. = 5 mm durch ein Massestück von etwa 50 g empfindliche Objekte bereits beschädigte.

Die Wirkung falscher Deckglasdicken ist leicht zu demonstrieren, indem man ein fein strukturiertes Objekt, z. B. einen Gewebeschnitt, mit einem starken Trockensystem mit Korrektionsfassung mikroskopiert und am Stellring für die Deckglasdicke unterschiedliche Werte einstellt.

Deckgläser für Blutzählkammern, i. allg. 0,4 mm dick, sind trotz ihrer optisch polierten Flächen wegen ihrer Dicke zur Bedeckung von Schnitt- und Ausstrichpräparaten nicht geeignet. Diese Dicke verhindert, daß die in den Zählkammern auftretenden großen Kapillarkräfte das Deckglas nach innen durchbiegen, damit das Kammervolumen verändern und das Zählergebnis beeinträchtigen, sie stört aber auch die sphärische Korrektion des verwendeten Objektivs.

Bei der Zählung von Blutzellen kann diese Störung in Kauf genommen werden, da Erythrozyten keine so feinen Details zeigen, daß ihre Abbildung hierdurch unbrauchbar würde. Für wesentlich feiner strukturierte Objekte aus Histologie, Zytologie, Bakteriologie u. ä. trifft diese Feststellung jedoch nicht zu.

Die geschliffenen Kanten der Zählkammerdeckgläser sind ein ausgezeichnetes Hilfsmittel zum Herstellen gleichmäßiger Ausstriche.

6.1.9.2. Einschlußmedien

Einschlußmedien für mikroskopische Präparate müssen vielen Forderungen genügen.

Alle derartigen Mittel sollen farblos und lichtdurchlässig sein, sollen die histologischen und bakteriologischen Färbungen nicht angreifen, dürfen beim Erstarren nicht reißen und damit die Objekte beschädigen. Es dürfen sich keine Kristalle, doppelbrechende Zonen und Schlieren bilden. Sie müssen in leicht verarbeitbarem Zustand in den Handel kommen und möglichst rasch erstarren. In anderen Fällen sollen sie mit dem Medium, in dem die Objekte leben, möglichst identisch sein. Sie sollen einerseits lebensfördernd wirken und Sauerstoff enthalten, andererseits sollen sie lähmen oder betäuben. In manchen Fällen sollen die Einschlußmittel eine gewisse Brechzahldifferenz zum Objekt haben, um z. B. die kontrastierende Wirkung des Phasenkontrastverfahrens zu unterstützen, in anderen Fällen muß die Brechzahl genau bekannt sein, um durch Vergleich zum Objekt dessen Brechzahl bestimmen zu können.

Da die Einschlußmedien die Objekte umgeben, liegen sie im abbildenden Strahlengang und müssen deshalb bestimmten optischen Forderungen genügen. Verlangen die Eigenarten des Objekts oder Besonderheiten des Präparationsverfahrens die Verwendung einer bestimmten Substanz, so ist es zweckmäßig, deren Eigenschaften zu ermitteln, um Störungen vorzubeugen oder diese deuten zu können.

Allgemeine oder spektrale Durchlässigkeit können bei der Mikroskopie von Objekten in farbigen oder trüben Medien Bedeutung gewinnen, wenn aus biologischen Gründen die Objekte in ihrem Nährmedium beobachtet werden müssen. Farbige Einschlußmassen, z. B. gelbe Balsamzubereitungen, können Farbstiche in Coloraufnahmen verursachen. Da es sehr mühselig ist, derartige Fehler mit Konversionsfiltern oder Antifarbstichfolie zu kompensieren, sollte man schon während der Präparatherstellung auf farblose Einschlußmedien achten. Der Fachhandel bietet eine Vielzahl an. Moderne Einschlußmittel greifen histologische Färbungen i. allg. nicht an. Wird gelegentlich aus besonderen methodischen Gründen eine Substanz benutzt, deren Eigenschaften nicht genügend erprobt sind, überzeugt man sich durch Präparationsversuche von der Eignung für den vorliegenden Zweck und stimmt gegebenenfalls Färbeverfahren und Einschlußmedium aufeinander ab. Der pH-Wert des Mediums kann z. B. eine erhebliche Rolle spielen, wenn die verwendete Färbemethode gegen Abweichungen von einem bestimmten pH-Bereich empfindlich ist.

Für die Präparation von Objekten, die im Phasenkontrast beobachtet und längere Zeit aufbewahrt werden sollen, eignet sich nach eigener Erfahrung Glyzeringelatine als Einschlußmedium.

Fettfärbungen schließen die Arbeit mit fettlösenden Mitteln, z. B. Alkohol, Benzol und Xylol aus, wodurch die Eindeckung in Balsam unmöglich wird. Hier muß dann Lävulose,

Gummisirup oder Glyzerin an die Stelle des Balsams treten. Die bekannten Handbücher berücksichtigen in ihren Rezeptteilen derartige Besonderheiten [224] [395] bis [397] [400] [408] [412] [417].

Einschlußmedien werden meist so benutzt, wie man sie aus dem Fachhandel bezieht, oder nach Rezepten der einschlägigen Literatur selbst hergestellt. Jedoch gibt es Fälle, in denen Änderungen der Brechzahl der Substanz wünschenswert sind. Hierher gehören Brechzahlbestimmungen nach der Immersionsmethode in Mineralogie und Biologie und die Verminderung der beim Phasenkontrastverfahren auftretenden Lichthöfe an den Konturen der Objekte durch Optimierung der Brechzahldifferenz zwischen Objekt und umgebendem Medium [96].

In Spezialfällen, z. B. bei der Bestimmung von Kieselalgen anhand ihrer Schalenstruktur, kann die Steigerung der Brechzahl des Einschlußmediums Vorteile bringen. Der Fachhandel bietet derartige Substanzen, z.B. Styrax, Hyrax und Jodsilber an. Die Brechzahlen findet man in der Fachliteratur der Präpariertechnik oder auf den Etiketten der Aufbewahrungsgefäße.

Zur Umrandung von Präparaten mit nicht aushärtenden oder flüssigen Einschlußmitteln benutzt man Wachs- oder Lackgemische, deren Rezepturen in Handbüchern zu finden sind, falls man nicht vorzieht, handelsübliche Mittel zu verwenden.

6.1.9.3. Objektkammern

Objektkammern für Durchlichtbeobachtung bestehen grundsätzlich aus dem Objektträger – dem Kammerboden und dem Deckglas – dem Abschlußglas der Kammer. Bei Vorhaben, die die Beobachtung eines Objekts innerhalb einer Kammer verlangen, müssen deshalb die Regeln beachtet werden, die die Theorie des Mikroskops für Objektträger- und Deckglasbenutzung aufstellt.

Die Verwendung von Objektkammern wird dann erforderlich, wenn die Beobachtung des Objekts unter Bedingungen erfolgen soll, die von den im Arbeitsraum herrschenden weitgehend abweichen. Schon die Beobachtung lebender Wasserorganismen kann den Einsatz mehr oder weniger komplizierter Kammern erfordern. Es kann aber auch sein, daß bestimmte Versuchsbedingungen, denen das Objekt ausgesetzt werden soll, z.B. in bezug auf Temperatur, Luftfeuchte, Gasdruck, Nährbodenvarianten u.a., zu ihrer Realisierung einen begrenzten, abgeschlossenen Raum, also eine Kammer verlangen. In allen Fällen muß die Kammer den Bedingungen genügen, die das Mikroskop und das gewählte oder erforderliche Beobachtungsverfahren stellen. Die Lebensbedingungen des Objekts und die gewünschten Versuchsbedingungen müssen möglichst genau und reproduzierbar realisiert werden können.

An eine Kammer zur mikroskopischen Beobachtung müssen deshalb u.U. erhebliche technische Forderungen gestellt werden, die meist die Hilfe einer erfahrenen Versuchswerkstatt unentbehrlich machen. Von einer einfachen Kammer kann man schon sprechen, wenn das Deckglas durch Unterlagen unterstützt wird, um beweglichen oder druckempfindlichen Objekten, z.B. Infusorien, ausreichend Raum zur Bewegung zu lassen (Bild 6.146).

Als handelsüblich sind Zählkammern zu nennen, die unter dem spezifizierenden Namen Blutzählkammer weithin bekannt sind [416] [420]. Dasselbe gilt für Feuchtkammern für Mikrurgie [405] und Sedimentationskammern für die Planktonmikroskopie [412] [422]. Die Liquorsedimen-

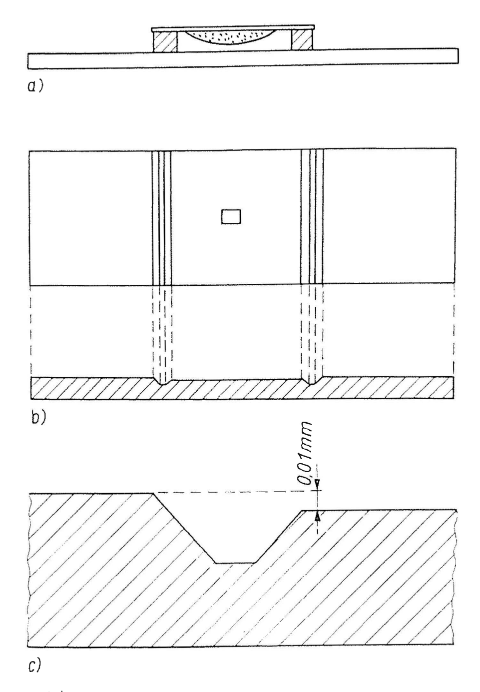


Bild 6.146. Objektkammern

a) einfache Form der Objektkammer für Präparation im hängenden Tropfen;
b) Zählkammer in Aufsicht- und Längsschnitt;
c) vergrößerte Detaildarstellung von Kammer und Überlaufrinne im Längsschnitt, Erläuterung der Kammertiefe

tationskammer nach *Sayk* [415] ist nicht unter die hier zu erwähnenden Geräte zu zählen, da sie keine echte Beobachtungskammer ist, sondern bislang nur der schonenden Sedimentation von Liquorzellen dient, die später zu Präparaten für Durchlichtmethoden verarbeitet werden. Handelsüblich ist z. Z. auch eine Zytophoresekammer [413] zur Beobachtung der Wirkung elektrophoretischer Methoden auf die lebende Zelle.

Der Vollständigkeit halber seien hier auch bestimmte Formen von Durchflußkammern erwähnt [411].

Wesentlich größer als die Anzahl der industriell gefertigten Objektkammern ist die der für Spezialzwecke aller Art labormäßig hergestellten. Jedem, der in dieser Beziehung auf Probleme stößt, sei die Übersicht von *Reumuth* und *Loske* [410] empfohlen, die neben vielen technischen Anregungen eine umfangreiche Literatursammlung über Beobachtungskammern und -küvetten aller Art bringt.

In Verbindung mit einem Temperiertisch (s. Abschnitt 10.) können viele Objektkammern zu Temperierkammern umgewandelt werden.

Die Zählkammer ist i. allg. ein Objektträger englischen Formats, jedoch größerer Dicke als handelsübliche Objektträger. Dieser Zählkammerobjektträger hat auf seiner Oberseite einen Einschliff bestimmter Tiefe, auf dessen Boden ein Zählnetz definierter Maschenweite aufgebracht ist. Unter Berücksichtigung der vorgegebenen Kammertiefe steht also über jedem Feld des Zählnetzes ein definiertes Volumen, dessen Teilchengehalt durch Auszählen bestimmt werden kann. Sehr dichte Suspensionen, z. B. Blut und Bakterienkulturen in Nährlösungen, müssen vor der Zählung nach einem von der tatsächlichen Dichte abhängigen Schlüssel verdünnt werden [416] [420].

Um die Zählkammer herum sind Überlaufrinnen angebracht, die überschüssige, beim Auflegen des Deckglases austretende Flüssigkeit aufnehmen. Fehlen diese Rinnen, so besteht die Gefahr, daß das Deckglas auf der Suspension schwimmt und dadurch nicht mit einem definierten Volumen gearbeitet wird. Der Vermeidung solcher Fehler dient auch die große Dicke der Zählkammerdeckgläser. Dünne Gläser würden unter der Wirkung der in der Kammer auftretenden Kapillarkräfte nach unten durchgebogen, wodurch sich das Zählvolumen verändert. Aus dem gleichen Anlaß besteht auch die Arbeitsvorschrift, das Deckglas möglichst fest aufzudrücken.

Zählkammern gibt es mit unterschiedlichen Kammertiefen. Handelsüblich sind 0,01 bis 0,4 mm, je nach Verwendungszweck. Die Zählnetze sind so ausgelegt, daß sie, bezogen auf eine bestimmte Kammertiefe, über jeder Teilfläche ein bestimmtes Volumen aufweisen, so daß unter Berücksichtigung des u. U. notwendigen Verdünnungsfaktors bei Routineuntersuchungen mit einer einmal festgelegten Umrechnung gearbeitet werden kann.

Die Planktonsedimentationskammern, als Röhrenverbundkammern bezeichnet, sind speziell für die Beobachtung mit dem umgekehrten Mikroskop im durchfallenden Licht konstruiert. Sie bilden ein System von Kammern mit gestuftem Volumen und sind zur Zählung des Planktongehalts von Wasserproben bestimmt [422]. Da Arten- und Individuenanzahl der Planktonorganismen für den Verschmutzungs- bzw. Reinheitsgrad des Wassers, für seinen Gehalt an bestimmten Stoffen sowie auch für den Fischreichtum bedeutend sind, ist die Methode der Planktonzählung mit dem umgekehrten Durchlichtmikroskop und der Röhrenverbundkammer zur Routinemethode der Hydrobiologie geworden.

Die Zytophoresekammer dient dazu, Elektrophoreseerscheinungen, speziell den Transport der Zellen im Medium, unter dem Mikroskop sichtbar zu machen. Die Methode erfordert ein horizontal liegendes Mikroskop, das zweckmäßig ein Phasenkontrastgerät sein sollte [413], da die Zytophorese bevorzugt mit Suspensionen lebender Zellen arbeitet. Die hierfür erforderlichen Kammern sind doppelwandig, um mit Durchflußtemperierung die für die Reproduzierbarkeit der Elektrophoreseerscheinungen erforderliche Temperaturkonstanz zu erzielen. Zytophoresekammern müssen leicht zerlegbar sein, um die notwendige gründliche Reinigung und Desinfektion vornehmen zu können.

Einen Sonderfall der Objektkammern stellen die in der Mikrobiologie gelegentlich verwendeten Kapillarkammern dar, die dem Zweck dienen, die Mikroorganismen isoliert aufzunehmen und der Beobachtung zugänglich zu machen [407]. Die optische Hauptschwierigkeit liegt in der Wirkung der Kapillaren als Zylinderlinsen. Man kann dem durch Einlegen der Kapillaren in Immersionsflüssigkeit begegnen, doch sind auch erfolgreiche Versuche zum Herstellen von Kapillaren mit parallelen ebenen Wänden gemacht worden [408].

6.1.9.4.
Herstellen von Dünnschliffen natürlicher und technischer Produkte

von Ing. *Joachim Bergner*

Unter Dünnschliffen versteht man die zur mikroskopischen Durchlichtuntersuchung präparierten,

auf eine Dicke von wenigen hundertstel Millimetern geschliffenen und auf einen Objektträger aufgekitteten Proben aus vorwiegend durchsichtigem Material. Unabhängig von den mechanischen Hilfsmitteln kann die Herstellung eines Dünnschliffs auf folgende fünf Bearbeitungsstufen zurückgeführt werden:

1. Abtrennen der Probe
2. Anschleifen der ersten Fläche
3. Aufkitten der Probe auf den Objektträger
4. Dünnschleifen
5. Fertigstellen des Schliffs.

Beim Abtrennen der Probe vom Originalstück ist zu beachten, daß durch diesen Arbeitsgang keine Änderung des Materials hervorgerufen werden darf. Selbst wenn es zu keiner Umformung des Materials kommt, bewirkt eine zu starke mechanische Beanspruchung auf dieser Arbeitsstufe eine merkliche Erschwernis für die ordnungsgemäße Fertigstellung des Schliffs. Die beste Art der Probenabtrennung ist die des Trennschleifens, wobei für petrografisches und keramisches Material Diamanttrennschleifkörper mit kontinuierlich besetztem Scheibenrand anzuwenden sind. Für mineralisierte organische Materialien (Knochen, Zähne) können auch Verbundschleifkörper aus Korund oder Karborund verwendet werden. Der Schnitt soll unter ständiger Kühlung von Schleifkörper und Probe mit gleichmäßigem Druck durchgeführt werden, so daß eine ebene und möglichst riefenfreie Schnittfläche entsteht. Materialien mit einer ausgesprochenen Schichttextur werden vor dem Schneiden zweckmäßig in einem geeigneten Material (Siegellack, Gips, Plast) eingebettet, um ein Auseinanderfallen der Probe zu verhindern. Während bei gleichmäßig körnigem Material durch das Trennschleifen Probenkörper bis herab zu 1 mm Dicke hergestellt werden können (geringere Dicken sind zwar auch möglich, aber für die Weiterverarbeitung nicht zu empfehlen), sollen gebänderte Proben etwas dicker (etwa 2 mm) geschnitten werden. Poröse Proben erfordern vor dem Schneiden eine Imprägnation. Hierzu wird zweckmäßig das gleiche Mittel verwendet, mit dem der Schnitt später auf den Objektträger aufgekittet werden soll. Bei petrografischen Präparaten (Gesteinsdünnschliffe) soll das Imprägnierungsmittel eine Brechzahl von etwa 1,535 (entspricht der des Kanadabalsams) haben, damit die Bestimmung der Mineralien nach dem Relief bzw. der Beckeschen Linie durchgeführt werden kann. Zum Imprägnieren der porösen Proben genügt es meist schon, die Probe so in eine Schale mit dem Einbettungsmedium zu legen, daß ein Teil von ihr aus diesem herausragt. Ist es entsprechend dünnflüssig, wird es durch Kapillarkräfte in die Poren und Risse der Probe gezogen. Reicht diese Methode nicht aus, so ist die Vakuumimprägnierung durchzuführen. Die im Einbettungsmedium gelagerte Probe wird hierzu in einen evakuierbaren Exsikkator gelegt. Nach dem Erzeugen eines Vakuums wird der Exsikkatorhahn geöffnet; durch den jetzt wirkenden Luftdruck wird das Einbettungsmedium in die poröse Probe gedrückt. Das Trennen dieser Proben kann nach dem Aushärten des Einbettungsmediums erfolgen. Die Schnitte sind durch weiteres Schneiden oder Brechen auf die dem Objektträger entsprechende Größe zu bringen. Für das Objektträgerstandardformat 26 mm × 48 mm soll der Schnitt eine Größe von 20 mm × 40 mm nicht überschreiten. Das Brechen von 1 bis 2 mm dicken Scheiben kann sehr sicher und genau durchgeführt werden, wenn man die Scheibe über eine rechtwinklige metallische Kante wegbricht.

Die weiteren Bearbeitungsstufen und die dabei erforderlichen Hilfsmittel sollen am Werdegang eines Gesteinsdünnschliffs beschrieben werden. Sinngemäß trifft das gleiche auf andere Ausgangsmaterialien zu.

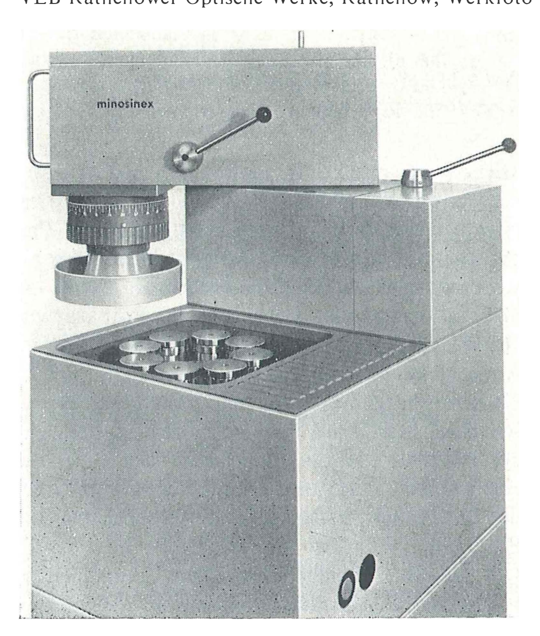
Die mit der Trennschleifmaschine hergestellte Gesteinsscheibe wird einseitig angeschliffen, so daß eine ebene, poren- und kratzerfreie Oberfläche entsteht. Das Schleifen erfolgt im allgemeinen auf Glas- oder Gußeisenscheiben mit Karborund, Korund oder Schmirgel in wäßriger Aufschwemmung. Ist die zu bearbeitende Probe wasserlöslich, wird als Schleifhilfsstoff Petroleum, Alkohol oder Äthyl-Glykol verwendet. Die Körnung des Schleifmittels braucht nach dem Trennschleifen nicht größer als 30 µm zu sein; zum Feinschleifen wird Schleifmittel von etwa 10 µm Körnung verwendet. Für den gleichen Zweck können auch Diamantschleifkörper in Kunstharzbindung mit einer Korngröße von etwa 20 µm verwendet werden. Die so bearbeitete Fläche zeigt einen seidenmatten Glanz; eine Politur wird nicht durchgeführt.

Die fertig bearbeitete erste Seite der Gesteinsscheibe wird mit einem geeigneten Kitt (farblos, dünnflüssig, schnellhärtend, Brechzahl um 1,535) auf einen Objektträger so aufgekittet, daß rings um die Scheibe ein mindestens 3 bis 4 mm breiter Kittrand entsteht. Dieser verhindert beim Dünnschleifen das seitliche Wegbröckeln des Dünnschliffs. Beim Kitten ist auf größte Sauberkeit zu achten; Staubpartikeln und Textilfasern sind sorg-

fältig zu entfernen, weil beide aufgrund ihrer optischen Anisotropie die Untersuchung des Dünnschliffs mit dem Polarisationsmikroskop erheblich stören. Die Kittschicht soll durch entsprechenden Druck möglichst gering gehalten werden (Größenordnung 5 µm). Dies gewährt speziell bei der maschinellen Schliffbearbeitung ein ausreichend paralleles Endprodukt. Die Haftfestigkeit der Gesteinsscheibe am Objektträger kann durch leichtes Anschleifen des Glases mit 10-µm-Schleifmittel verbessert werden. Diese Methode ist jedoch zu vermeiden, wenn der Dünnschliff im Phasen- oder Interferenzkontrast untersucht werden soll.

Nach dem Aushärten des Kitts kann mit dem Dünnschleifen begonnen werden. Hierzu verwendet man zunächst eine Gußscheibe mit einer Aufschwemmung von 100-µm-Schleifmittel bzw. einen Diamantschleifkörper mit 60-µm-Körnung. Für die Dünnschliffeinrichtung minosinex der Rathenower Optischen Werke (Bild 6.147) ist in dieser Arbeitsstufe 30-µm-Schmirgel vorgesehen. Die Drehzahl des Schleifkörpers beträgt 90 U/min. Die Abtragerate beträgt etwa 0,1 mm/min, d.h., der gesamte Vorschliff ist in etwa 10 min beendet. Geschliffen wird so bis zu einer Objektdicke von etwa 120 bis 150 µm. Zum Feinschliff wird wesentlich feinkörnigeres Schleifmaterial verwendet (Körnung 10- bzw. 20-µm-Diamantschleifkörper). Mit der Verringerung der Schleifmittelkörnung muß auch die Schleifgeschwindigkeit reduziert werden. Die minosinex gestattet hierzu das Umschalten auf eine Schleifkörperdrehzahl von etwa 40 U/min. Der Schliff wird bis auf etwa 25 µm Dicke heruntergeschliffen, wobei in der Endphase öfter eine mikroskopische Kontrolle vorgenommen werden soll (Bestimmung der Schliffdicke anhand der Interferenzfarbe eines bekannten Mineralkorns, z.B. Quarz; s. Abschn. 6.1.4.4.).

Bild 6.147. Teilansicht der Dünnschliffeinrichtung minosinex
links der ausgeschwenkte Schleifkörper, in der Vertiefung acht Schliffhalter sichtbar
VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow, Werkfoto



Nach dem Dünnschleifen erfolgt im Regelfall das Fertigstellen des Schliffs durch Aufkitten eines Deckglases. Dazu wird zunächst der über den fertigen Dünnschliff überstehende Kittrand entfernt, am besten unter dem Stereomikroskop mit einem Skalpell. Hierbei läßt sich der Dünnschliff auch noch etwas formieren. Nach dem gründlichen Säubern mit einer Bürste unter fließendem Wasser und anschließendem Trocknen wird ein Tropfen Kitt auf den Schliff gebracht und dieser mit dem gesäuberten Deckglas (Dicke 0,15 bis 0,17 mm) über die gesamte Schliffläche verteilt. Eventuell entstandene Luftblasen können vorsichtig mit einem Holzspatel herausgedrückt werden. Das Eindecken mit Kaltkitt ist das schonendste Verfahren, weil hierbei die feste Verbindung zwischen Dünnschliff und Objektträger nicht wieder gelöst wird wie beim Warmeindecken. Damit kann der Dünnschliff auch nicht auseinanderfallen und wegschwimmen. Mitunter wird aufgrund mechanischer Beanspruchung die Verbindung zwischen Dünnschliff und Objektträger während des Schleifens auf mehr oder weniger großen Stellen unterbrochen. Dies ergibt blinde Stellen, die beim Mikroskopieren sehr stark stören und u.U. sogar falsche Strukturen vortäuschen können (Bild 6.148). Kann man solche Ablöseerscheinungen nicht grundsätzlich durch entsprechende Steuerung des Kitts vermeiden, so können sie beim Eindecken dadurch beseitigt werden, daß man zum Aufkleben des Deckglases mit Xylol verdünnten Kanadabalsam verwendet. Dieser sehr dünnflüssige Kitt kriecht durch die feinsten Poren und Risse und füllt die abgelösten Stellen wieder auf. Voraussetzung für diese Methode ist jedoch die Übereinstimmung der Brechzahlen des zum Aufkleben des Dünnschliffs verwendeten Kitts und des Kanadabalsams. Der so behandelte Schliff wird zum Aushärten mindestens 6 h bei 60°C getrocknet.

In speziellen Fällen wird der Dünnschliff nicht mit einem Deckglas bedeckt, sondern poliert.

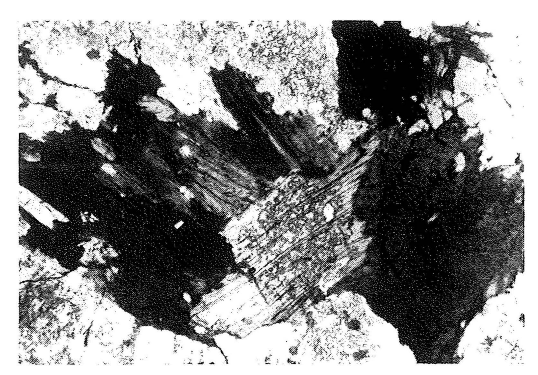


Bild 6.148. Gneis-Dünnschliff mit Ablöseerscheinungen des Kitts
Durchlicht-Hellfeld; 1 Polar; M 40 : 1

Diese polierten Dünnschliffe bringen für die mikroskopische Untersuchung verschiedene Vorteile, weil sie sowohl im Durch- als auch im Auflicht untersucht werden können. Damit wird die Bestimmung opaker Bestandteile des Dünnschliffs, die sonst nur nach der Morphologie möglich ist, erleichtert. Das Polieren von Dünnschliffen wird nach der Tuchmethode vorgenommen, womit ausreichend gute und reliefarme Polituren von petrografischen und keramischen Materialien möglich sind. Das Polieren wird wie das Dünnschleifen in zwei Stufen durchgeführt. Zum Vorpolieren wird am vorteilhaftesten Diamantpaste (etwa 5-µm-Körnung) auf Nylontuch verwendet, während zur Feinpolitur feinkörnige Tonerde in wäßriger Aufschwemmung empfohlen wird. Beim Polieren von Dünnschliffen ist zu beachten, daß nur ein geringer Druck angewendet werden darf. Enthält der polierte Dünnschliff Bestandteile, die an der Luft oxydieren, so kann er für die Zeit der Nichtverwendung mit einem Plast- oder Lacküberzug, der sich leicht entfernen läßt, geschützt werden.

6.2. Auflichtmikroskopie

6.2.1. Hellfeld

von *Wolfgang Oettel*

Da das Sehen der Umwelt auf der Tatsache beruht, daß das auf die Gegenstände auffallende Licht meist diffus, seltener regulär reflektiert wird, ist es nicht erstaunlich, daß die ersten Mikroskope reine Auflichtmikroskope waren. Sie wurden zur Betrachtung natürlicher Oberflächen benutzt. Als es *Tortona* [427] gelang, ein Durchlichtmikroskop herzustellen, wurde die Auflichtmikroskopie sehr rasch von der Durchlichtmikroskopie überflügelt.

Gegen Ende des vorigen Jahrhunderts [434] wurde, vor allem durch die Pionierarbeiten von *Martens*, der Nachweis erbracht, daß man von metallischen Werkstoffen geeignete Schliffe herstellen kann. Da sie es zuließen, die einzelnen Gefügeausbildungen zu erfassen, ihre Veränderungen zu erkennen und deren Ursachen zu klären, erhielt die Auflichtmikroskopie neuen Auftrieb. Sehr schnell kam zur Metall- noch die Erzmikroskopie, und heute gibt es kaum noch einen Zweig der Technik, in den nicht schon das Auflichtmikroskop eingedrungen ist. Damit hat die Auflichtmikroskopie eine völlig gleichberechtigte Stellung gegenüber der Durchlichtmikroskopie erlangt. Bei der Auflichtmikroskopie muß die Forderung erhoben werden, daß das Präparat einen ausreichenden Teil des auffallenden Lichts ins

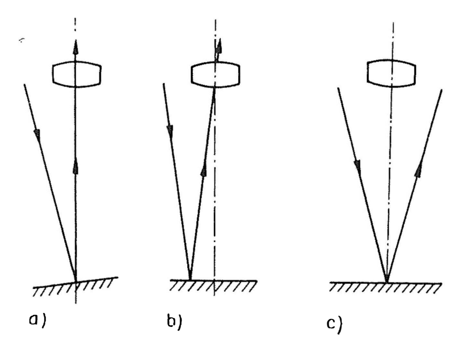


Bild 6.149. Schema der Lageabhängigkeit bei Auflichtbeleuchtung

Mikroskop reflektiert, damit ein noch wahrnehmbares mikroskopisches Bild entsteht. Dies setzt voraus, daß die Oberfläche des Präparats hinreichend eben und glatt ist und im allgemeinen rechtwinklig zur optischen Achse des Mikroskopobjektivs steht. Hat das Präparat von Natur aus keine solche Oberfläche, so ist es die Aufgabe der Präpariertechnik (s. Abschn. 6.2.7.), die notwendigen Oberflächenvoraussetzungen zu schaffen. Man muß beachten, daß in der Auflichtmikroskopie die Oberfläche des Präparats eine optisch wirksame Fläche ist, die entscheidenden Anteil an der Güte des mikroskopischen Bilds hat.

Um in der Auflichtmikroskopie beurteilen zu können, welche Art der Beleuchtung vorliegt, muß

man ein Präparat betrachten, das zumindest stellenweise das Licht regulär reflektiert. Wird die Beleuchtung im Mikroskop so geführt, daß das an diesen Stellen regulär reflektierte Licht ohne weitere Eingriffe zur Bilderzeugung mit beitragen kann, so erscheinen die in diesen Stellen eingelagerten gemischt bzw. zerstreut reflektierenden Teilchen mehr oder weniger dunkel auf hellem Feld. Man spricht dann von Auflichthellfeld.

Wie im Bild 6.149 gezeigt wird, spielt im Auflicht die Lage der zu betrachtenden Präparatstelle eine große Rolle. Würde diese Stelle statt schräg (Bild 6.149 a) rechtwinklig zur optischen Achse des Objektivs oder statt außerhalb (Bild 6.149 b) in ihr liegen, so würde das regulär reflektierte Licht nicht ins Objektiv (Bild 6.149 c) gelangen, es würde also Dunkelfeld vorliegen. Man spricht in den Fällen a) und b) davon, daß das Bild Hellfeldcharakter habe, aber die Beleuchtungsanordnung wird zu den Dunkelfeldanordnungen gezählt. Diese Lageabhängigkeit ist zu beachten, wenn man größere Werkstücke, deren Flächen nicht eben zu sein und rechtwinklig zur optischen Achse des Objektivs zu liegen brauchen, oder gar Brüche betrachtet.

Bei normaler Präparatlage erhält man Hellfeld entweder unter Benutzung eines Planglasilluminators oder eines Prismen- bzw. Spiegelilluminators. Wenn der freie Objektabstand groß genug ist, kann man das unter 45° zur optischen Achse geneigte Planglas zwischen Präparat und Objektiv anbringen (Bild 6.150 a), andernfalls

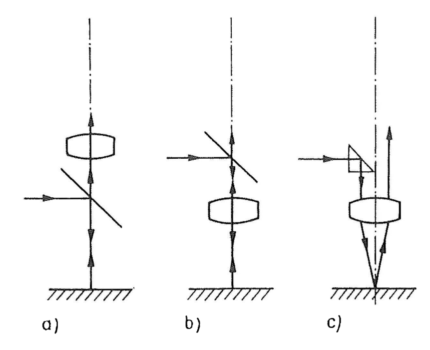


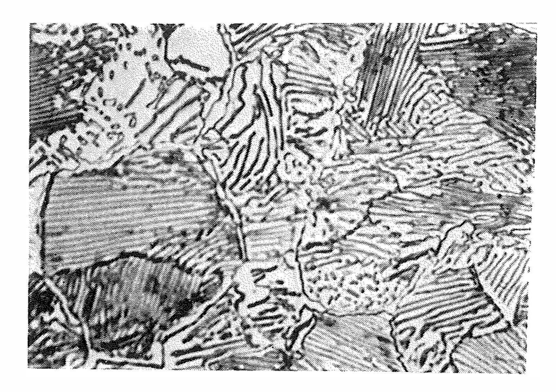
Bild 6.150. Schema der Hellfeldbeleuchtungsarten

Tafel 6.9. Vor- und Nachteile von Illuminatoren und ihre Anwendung

Planglasilluminatoren	Prismenilluminatoren
Vorteile:	
keine Einschränkung der Objektivapertur, daher volles Auflösungsvermögen	praktisch nicht merkbare Intensitätsverluste des eingestrahlten Lichts
in Achsennähe gerade, sonst rotationssymmetrisch schräge Beleuchtung	Beim Durchgang durch ein Berek-Prisma bleibt ein homogenes, linear polarisiertes Feld hinreichend gut erhalten
praktisch keine Abhängigkeit der gleichmäßigen Ausleuchtung des Dingfelds und der Bildqualität von der Lage des Planglases zu den Pupillen	
Nachteile	
Etwa 23% des beleuchtenden Lichts sind maximal für die Bilderzeugung ausnutzbar	Einschränkung der Objektivapertur, damit Herabsetzung des Auflösungsvermögens für Strukturen parallel zur Prismen- oder Spiegelkante beim Zungenspiegel und beim total reflektierenden Prisma starke Depolarisation des linear polarisierten Lichts
Bei schwach reflektierenden Präparaten treten leicht störende Schleier auf, die durch Zentralblenden und andere Mittel gebessert werden können	
Bei nichtneutraler halbdurchlässiger Schicht ist mit einer Veränderung der Farbtöne zu rechnen	Abhängigkeit der Ausleuchtung des Dingfelds und der Bildqualität von der Lage des Prismas zu den Pupillen
Aus linear polarisiertem Licht wird elliptisch polarisiertes	Die einseitig schräge Beleuchtung kann zu Interpretationsfehlern führen
Anwendung:	
in der Metallografie und bei hochreflektierenden Objekten. Der diffuse Schleier wird hier überdeckt. Es sind nur qualitative Untersuchungen im polarisierten Licht möglich	bei allen Präparaten, unabhängig von ihrem Reflektionsvermögen. Für quantitative Untersuchungen im polarisierten Licht kommt nur das Berek-Prisma in Frage. Es ist in der Aufbereitungs-, Erz- und Kohlemikroskopie nicht zu entbehren

wird es hinter dem Objektiv im Tubus angebracht (Bild 6.150 b). Damit das Planglas die Bildgüte nicht beeinflußt, muß es planparallel, unverspannt und hinreichend dünn sein. Ferner wird es auf der dem Präparat zugewandten Seite mit einer halbdurchlässigen und auf der Gegenseite mit einer reflexmindernden Schicht versehen. Anstelle des 90°-Prismas (Bild 6.150 c) kann man auch einen Zungenspiegel oder ein Kompensationsprisma nach *Berek* (s. Abschn. 6.2.4.) verwenden. Im Gegensatz zum Planglas dürfen diese drei Bauelemente höchstens die Hälfte der Objektivöffnung abdecken.

Die Tafel 6.9 soll eine bessere Übersicht über die Vor- und Nachteile der einzelnen Illuminatoren sowie über ihre Anwendung geben. Man ersieht daraus, daß in den meisten Fällen das Planglas dem Prisma vorzuziehen ist, zumal wenn die halbdurchlässige Schicht in ihrem optischen Verhalten keine merkbare Abhängigkeit von der Wellenlänge des Lichts aufweist, also praktisch neutral ist. Nur wenn im polarisierten Licht quantitative Beobachtungen gemacht werden sollen, ist auch heute noch ein Prismenilluminator nach *Berek* von Vorteil [426]. Die in Tafel 6.9 zusammengestellten Fakten bedürfen teils noch kurzer Erläuterungen oder sind durch entsprechende Mikroaufnahmen zu belegen. Im Bild 6.151 wird an lamellarem Perlit einwandfrei gezeigt, daß beim Planglas (Bild 6.151, oben) das volle Auflösungsvermögen erhalten geblieben ist, während beim Prisma (Bild 6.151, unten) feinere Lamellen parallel zur Prismenkante bereits nicht mehr aufgelöst werden.



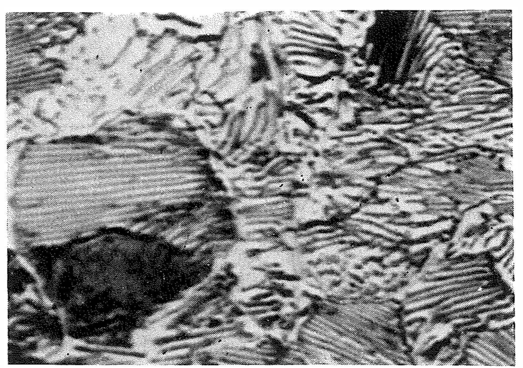


Bild 6.151. Einfluß des Tubusilluminators auf das Auflösungsvermögen

Die verschiedene Abhängigkeit der Ausleuchtung des Dingfelds und der Qualität des Endbilds von der Lage des Illuminators zu der Austrittspupille der Beleuchtungsanordnung bzw. des Objektivs ist so wichtig, daß hier etwas näher darauf eingegangen werden soll. Im Bild 6.152 sind die Verhältnisse beim Planglasilluminator wiedergegeben.

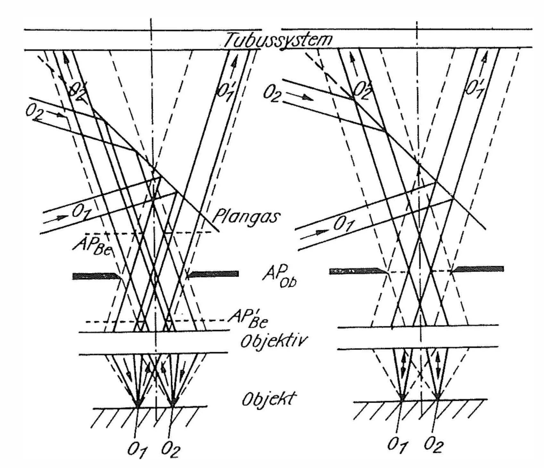


Bild 6.152. Abhängigkeit der Ausleuchtung und der Bildqualität von der Lage der Pupillen beim Planglasilluminator (Oettel 1959) [428]

Im allgemeinen liegt zwar die Austrittspupille der Beleuchtung AP_{Be} (Bild 6.152 links) zwischen Planglas und Objektiv, fällt aber nicht mit der Austrittspupille des Objektivs AP_{Ob} zusammen. Im Bild sind die entsprechenden Strahlenbündel für zwei Randpunkte des Dingfelds gezeichnet worden. Durch die AP_{Be}, die nur ein Bild einer reellen Blende sein kann, denn sonst würde sie auch in den beobachtenden Strahlengang eingreifen, werden die zur Beleuchtung der Punkte O_1 und O_2 dienenden Strahlenbündel bestimmt. Diese Bündel werden am Präparat teils regulär reflektiert, teils gebeugt. Die zum Aufbau der Bildpunkte O_1' und O_2' beitragenden Lichtbündel werden von der AP_{Ob} begrenzt. Bei richtiger Justierung und Dimensionierung des Planglases

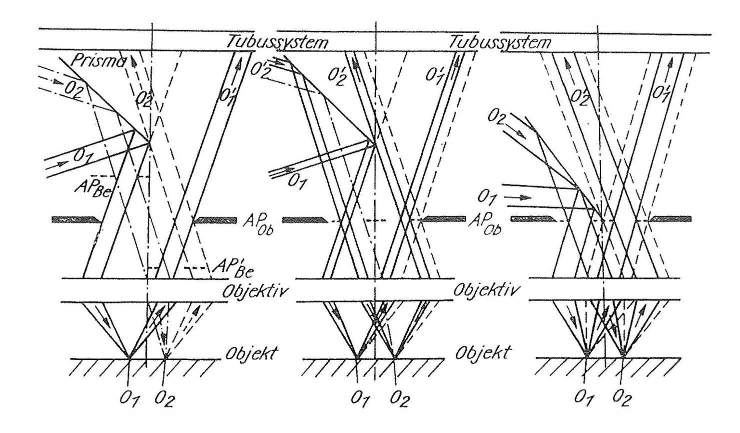


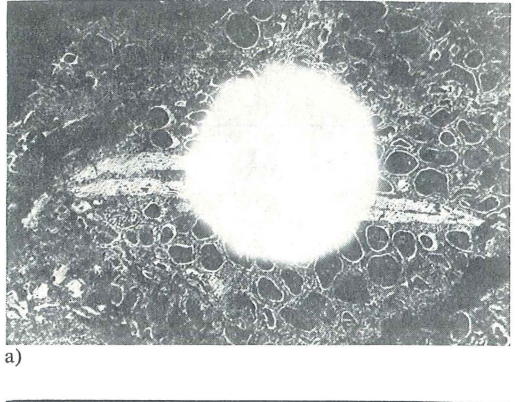
Bild 6.153
Abhängigkeit der Ausleuchtung und der Bildqualität von der Lage der Pupillen beim Prismenilluminator (Oettel 1959) [428]

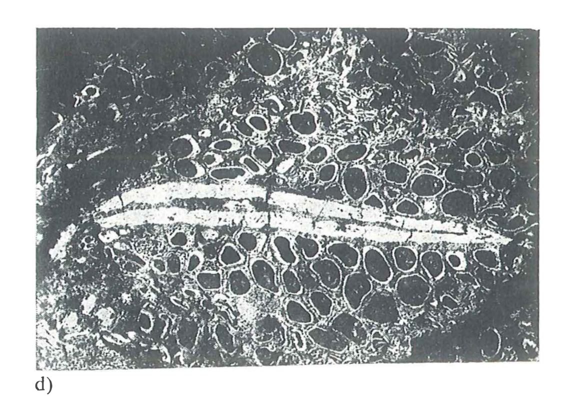
ist also das Bild sowohl in der Ausleuchtung als auch in der Qualität rotationssymmetrisch. Die am Rande auftretende schräge Beleuchtung läßt sich nur vermeiden, wenn die AP_{Be} in die AP_{Ob} gelegt werden kann (Bild 6.152 rechts).

Verwickelter ist die Abhängigkeit beim Prismenilluminator (Bild 6.153). Im allgemeinen Fall (Bild 6.153 links) ist die Aperturblende der Beleuchtungsanordnung so weit geschlossen und exzentrisch gestellt worden, daß man bei entferntem Okular in dem vom Prisma freien Raum ein Bild der Aperturblende sieht, das mit AP'_{Be} bezeichnet werden soll, da es gleichzeitig ein Bild der AP_{Be} ist. Die AP_{Be} wird, wie auch die Kante des Prismas, das nur mit seiner reflektierenden Grundfläche angedeutet ist, nicht mit der AP_{Ob} zusammenfallen. Man sieht sofort, daß das Bild vollkommen unsymmetrisch aufgebaut ist. Während bei O_1 noch regulär reflektiertes Licht zur Beobachtung beiträgt, wird das bei O_2 regulär reflektierte Licht vom Prisma abgefangen. Das Endbild weist demnach bei O'_1 Hellfeld-, bei O'_2 aber schon Dunkelfeldcharakter auf, da hier nur am Objekt abgebeugtes Licht zur Abbildung beiträgt. Legt man die AP_{Be} und damit auch AP'_{Be} in die AP_{Ob} (Bild 6.153 Mitte), so erhält das Endbild bei O'_2 auch Hellfeldcharakter. Die noch vorhandene Unsymmetrie in bezug auf Bildqualität verliert sich erst, wenn noch die Prismenkante nach AP_{Ob} verlegt werden kann (Bild 6.153 rechts). Bei kleineren Bildfeldern verringern sich die hier beschriebenen Auswirkungen.

Bekanntlich ist der Planglasilluminator in bezug auf Bildschleier und Reflexe störanfälliger als der Prismenilluminator. Im Auflicht lassen sich trotz Vergütung der Mikroskop-Optik sichtbare Bildverschleierungen durch das an den Glas-Luft-Flächen erzeugte Reflexlicht, besonders bei geringer Apertur der Beleuchtung und bei schlecht reflektierenden Präparaten, oft nicht vermeiden. Anhand von Aufnahmen sollen die Möglichkeiten kurz erörtert werden, die dem Mikroskopiker zur Verminderung von Bildverschleierungen und zur Beseitigung von Reflexen zur Verfügung stehen. Durch einen optischen Eingriff in eine Köhlersche Beleuchtungsanordnung wurde auf einem Kohleanschliff ein Aperturblendenreflex (Bild 6.154 a) erzeugt und die so veränderte Anordnung auch für die nächsten Aufnahmen beibehalten. Da die Linsenflächenreflexe meist aus dem achsennahen Raum kommen, kann man sie manchmal schon durch die Vergrößerung der Apertur der Beleuchtung herabsetzen (Bild 6.154 b). Durch Schließen der Leuchtfeldblende läßt sich der Kontrast weiter steigern (Bild 6.154 c). Ferner kann man Reflexlicht durch Übergang von der geraden zur einseitig oder besser allseitig schiefen Beleuchtung, zur sog. konischen Beleuchtung, durch Einführen von Ring- oder Zentralblenden umgehen (Bild 6.154 d). Endlich können Reflexschleier auch durch polarisationsoptische Mittel beseitigt werden (Bild 6.154 e). Zu diesem Zweck werden im Beleuchtungsstrahlengang ein Polarisator und im Beobachtungsstrahlengang ein Analysator so eingeschaltet, daß ihre Schwingungsrichtungen rechtwinklig aufeinanderstehen. Damit wird jedes Reflexlicht ausgelöscht. Um zu verhindern, daß dies auch mit den abbildenden Strahlen geschieht, wird zwischen Objektiv und Objekt unter 45° zu den Polaren orientiert eine $\lambda/4$-Platte angebracht.

Da die abbildenden Strahlen die Platte zweimal durchsetzen, wird ihre Schwingungsebene um $\lambda/2$ gedreht. Sie steht damit parallel zur Schwingungsrichtung des Analysators. Die abbildenden Strahlen werden somit durchgelassen. Selbstverständlich ist mit diesem Verfahren ein großer Intensitätsverlust verbunden. Die Belichtungszeit ist dementsprechend länger. Außerdem kann man


a)


d)

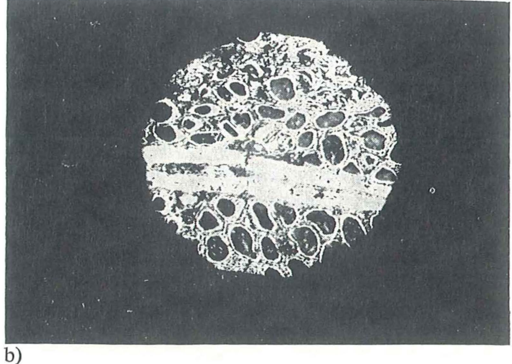
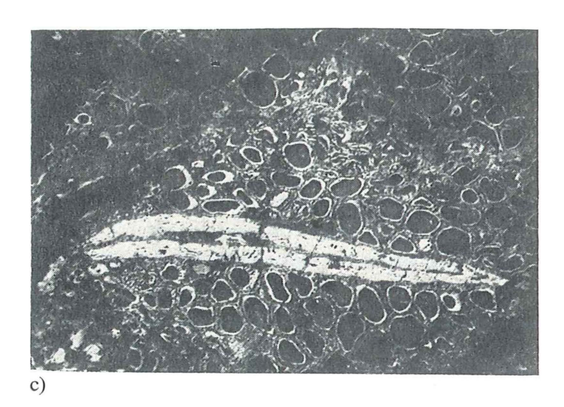
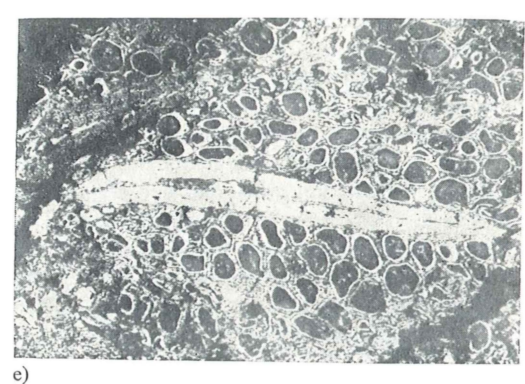

b)

Bild 6.154. Reflexlicht und Möglichkeiten seiner Beseitigung


c)


e)

bei schwach reflektierenden Objekten eine Kontraststeigerung erzielen, indem man eine Ölimmersion oder nach *Stach* [433] eine Methylenjodidimmersion anwendet. Schließlich haben *Pepperhoff* [430] und *Pusch* [431] gezeigt, daß durch Bedampfen von Präparaten geringen Reflexionsvermögens mit einer hochbrechenden Interferenzschicht geeigneter Dicke eine Reflexionserhöhung erzielt werden kann.
Weiterhin erreicht man eine Bildgüteverbesserung durch Anordnung des Planglasilluminators im telezentrischen Strahlengang. Entweder werden dazu Objektive mit unendlicher Bildweite und hinter dem Illuminator eine Tubuslinse verwendet oder es wird bei Objektiven endlicher Bildweite erst eine negative und hinter dem Illuminator eine positive Tubuslinse eingeschaltet. Beide Linsen können mit dem Illuminator zusammengebaut sein, so daß es dem Benutzer gar nicht aufzufallen braucht. Illuminatoren werden in Beleuchtungsanordnungen eingebaut, an die folgende Bedingungen zu stellen sind:

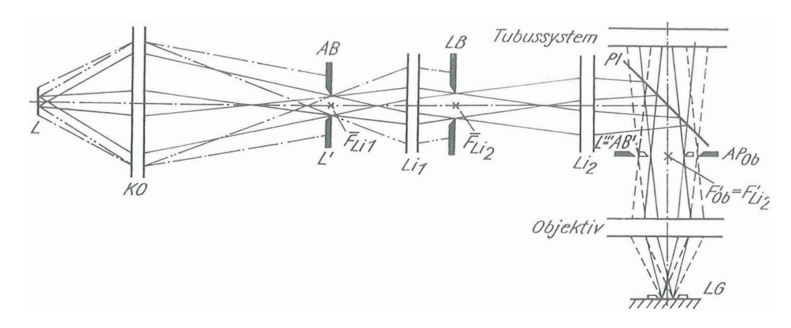
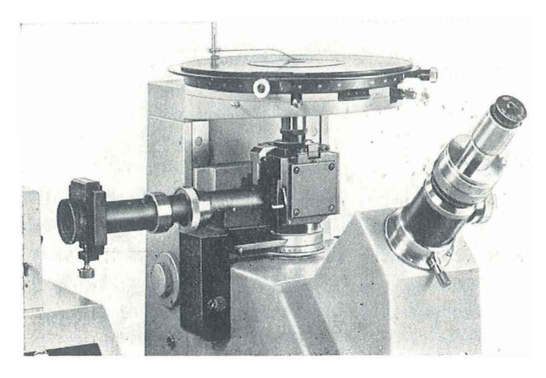


Bild 6.155
Beleuchtungsanordnung zur Durchführung des Köhlerschen Beleuchtungsprinzips (Oettel 1959) [428]

1. Die Beleuchtung des Dingfelds muß hinreichend stark und gleichmäßig sein.
2. Der Beleuchtungsstrahlengang ist so zu führen, daß Streulicht und Reflexe nach Möglichkeit vermieden werden.
   Dies wird durch Anpassen des Leuchtfelds an das Dingfeld erreicht.
3. Die numerische Apertur und die Einfallsrichtung des beleuchtenden Strahlenbündels müssen optimal an Objekt und Objektiv angepaßt werden können.

Diese Forderungen lassen sich ohne weiteres mit einer Anordnung nach dem Köhlerschen Beleuchtungsprinzip verwirklichen [429]. Im Bild 6.155 wird ihre gebräuchlichste Form für Objektive mit unendlicher Bildweite gezeigt.
Der Kollektor *KO* bildet die Lichtquelle *L* auf der Aperturblende der Beleuchtung *AB*, und die Linsen Li_1 und Li_2 bilden die Blende nach Reflexion am Illuminator in die Objektivbrennebene F'_{Ob} ab, wodurch die gleichmäßige Ausleuchtung der Präparatoberfläche gewährleistet ist. Die andere Blende *LB* wird durch die Linse Li_2 und das Objektiv auf das Präparat abgebildet. Sie wird somit zur Leuchtfeldblende.

Bild 6.156. NEOPHOT 2
Spezialilluminator für polarisiertes Licht
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



Im Normalilluminator zum Neophot 2 (Bild 4.34) ist z.B. eine solche Anordnung in Verbindung mit einem ausschiebbaren Planglasilluminator eingebaut. Man bringt das Planglas deshalb ausziehbar an, weil es im Dunkelfeldstrahlengang nicht gebraucht wird und dort etwa 50% des Lichts abfangen würde. Dagegen enthält der Spezialilluminator für polarisiertes Licht (Bild 6.156) die Anordnung mit einem Berek-Prisma, wobei die Leuchtfeldblende *LB* mit der Linse Li_2 zusammen so verschoben werden kann, daß die Lage des Bilds $L''' = AB''$ der Brennebene des jeweils benutzten Objektivs angepaßt werden kann. Beim Normalilluminator wurde auf das Schiebesystem verzichtet, weil bei den heutigen Objektiven die Lagen der Austrittspupillen bereits für Hellfeldbeobachtungen hinreichend genau zusammenfallen.
Manchmal wird aus konstruktiven und ökonomischen Gründen die von *Köhler* angegebene Beleuchtungsanordnung geändert, ohne die prinzipiellen Forderungen, Abbildung der Lichtquelle auf der Aperturblende und mit dieser zusammen in die Ebene der Objektivaustrittspupille und Abbildung einer in der Nähe des Kollektors gelegenen Ebene in die Leuchtfeldblende und mit ihr in die Objektebene, aufzugeben. Man verzichtet darauf, den Brennpunkt $\bar{F}_{Li1}$ in die Aperturblende *AB* (Bild 6.155) und den Brennpunkt F'_{Li2} in die Austrittspupille des Objektivs AP_{Ob} zu legen. Es genügt, die Aperturblende mit Hilfe einer oder zweier Linsen in die Objektivaustrittspupille abzubilden.
Werden Objektive mit endlicher Bildweite in Verbindung mit einer Beleuchtungsanordnung nach *Köhler* benutzt, so muß die Leuchtfeldblende an einer solchen Stelle angebracht werden, daß ihre Abbildung über eine Linse und das Objektiv in dessen Objektebene erhalten bleibt. Es sei hier darauf hingewiesen, daß im Auflicht die Objektive mit unendlicher Bildweite gegenüber solchen mit endlicher Bildweite echte Vorteile haben [433].

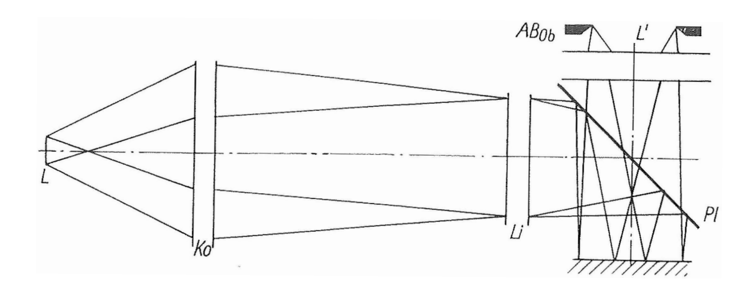


Bild 6.157. Hellfeldbeleuchtung für Lupenaufnahmen [428]

Allein der Planglasilluminator zwischen Objektiv und Objekt erfordert eine grundsätzlich andere Beleuchtungsanordnung (Bild 6.157).
Dabei wird die Lichtquelle *L* über den Kollektor *Ko* und die Linse *Li* nach Reflexion am Planglas und am Objekt in die Eintrittspupille des Objektivs abgebildet. Eine solche Anordnung wird auch in der Lupenfotografie angewendet. Sie ist beim Illuminator für schwache Vergrößerungen – 10× bis 50× – am NEOPHOT 2 (Bild 6.158) mit der Änderung übernommen worden, daß an

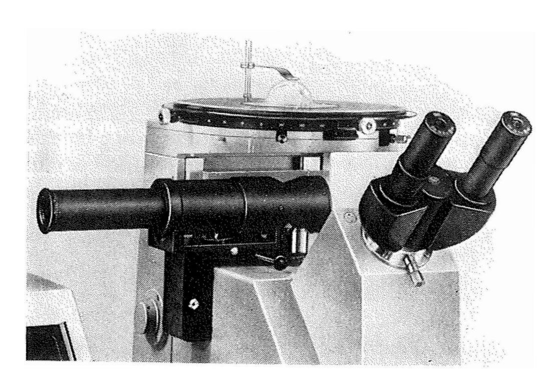
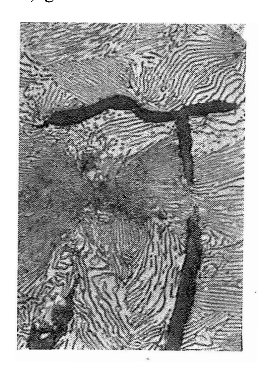


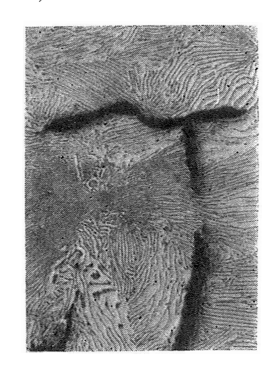
Bild 6.158. NEOPHOT-2-Illuminator für schwache Vergrößerungen

Bild 6.159. Steigerung der Auflösung durch konisch Beleuchtung

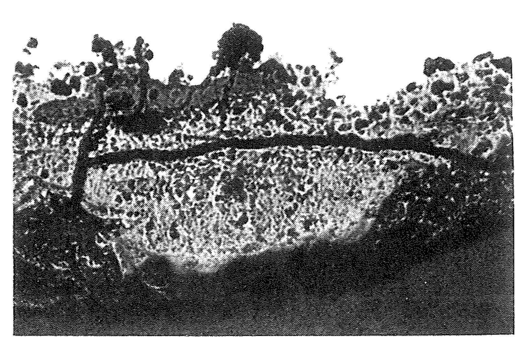
a) gerade



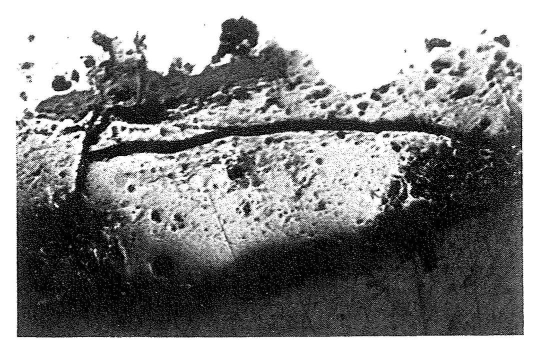
b) konisch



der Stelle der Lichtquelle *L* bereits eine Abbildung der tatsächlich gebrauchten Lichtquelle liegt.
Einen Sonderfall der Hellfeldbeleuchtung stellt die bewußt schräge Beleuchtung dar. Man unterscheidet hierbei die einseitige von der allseitigen oder konischen Beleuchtung. Die erste erhält man, wenn man die Aperturblende der Beleuchtung dezentriert, während man die andere durch Einführen von Zentral- oder Ringblenden erzielt. Ihre Benutzung erleichtert die Beobachtung von Oberflächenunebenheiten, steigert u. U. das Auflösungsvermögen (Bild 6.159 a und b) und kann zur Vermeidung von Lichtschleiern verwendet werden. Wie im Bild 6.160 a und b gezeigt wird, läßt sich mit der einseitig schrägen Beleuchtung auch besser eine Vertiefung ausleuchten, die hier beim Schleifen und Polieren zwischen der Probe und dem Einbettungsmittel entstanden ist.
Ferner sei noch darauf hingewiesen, daß es manchmal durchaus von Vorteil sein kann, die Auflicht-Hellfeldbeleuchtung mit einer solchen im Durchlicht zu kombinieren. Diese Mischlichtbeleuchtung bewährt sich bei durchbrochenen Objekten, wie Drahtnetzen und -geweben bzw. Pulvern und Körner-Locker-Präparaten. Bei Mischlicht müssen die beiden Beleuchtungsarten in der Intensität aufeinander abgestimmt werden. Dabei kann es durchaus eintreten, daß sich eine subjektive Abstimmung bei einer nachfolgenden Aufnahme noch als verbesserungsbedürftig herausstellen kann.
Zum Schluß dieses Abschnitts sei noch kurz auf die Frage eingegangen, ob man einem aufrechten oder einem umgekehrten Auflichtmikroskop nach *Le Chatelier* den Vorzug geben soll. Bei den großen Metall- und Erzmikroskopen, z. B. dem NEOPHOT 2, dürfte wohl immer der umgekehrte Typ vorgezogen werden, hat er doch zweifellos den Vorteil, daß auch sehr unregelmäßig geformte Schliffe einwandfrei ausgerichtet aufgelegt werden können.
Schwieriger zu beantworten ist die Frage bei den mittleren Auflichtmikroskopen, z. B. bei dem im



a) gerade



b) schräg

Bild 6.160. Einfluß der einseitig schrägen Beleuchtung

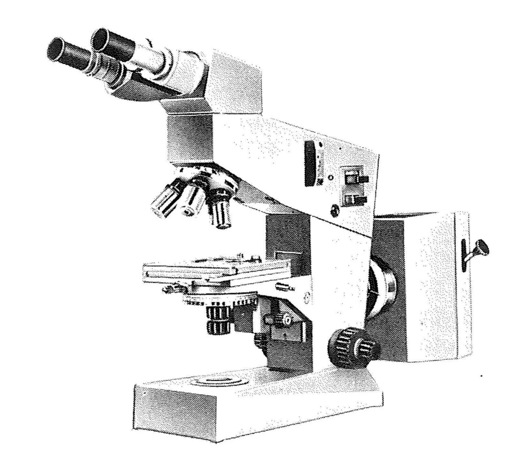


Bild 6.161. EPIVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Bild 6.161 dargestellten EPIVAL und bei dem EPIVERT (Bild 6.162). Hier halten sich die Vor- und Nachteile noch weitgehend die Waage. Spricht das schon erwähnte leichte Auflegen der Proben für die umgekehrte Bauart, so spricht die bequeme freie Übersicht über die gesamte Schliffläche

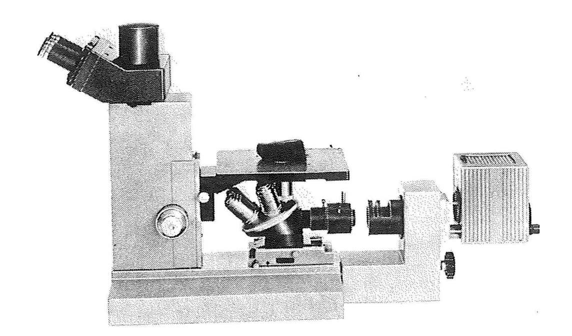


Bild 6.162. EPIVERT
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

zweifellos für die aufrechte Bauart. Anschlifftische sollen die sonst bei aufrechten Mikroskopen zum ausgerichteten Aufbringen der Proben erforderliche Schliffpresse überflüssig machen. Jede in der Weiterentwicklung dieser Tische in bezug auf eine schnellere Handhabung, eine größere Freiheit in der Form der Proben und eine Erweiterung der freien Übersicht erreichte Verbesserung wird sich ohne Zweifel zugunsten des aufrechten Auflichtmikroskops auswirken.

6.2.2. Phasenkontrast und Dunkelfeld (Auflicht)

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

6.2.2.1. Allgemeine Betrachtungen und Besonderheiten bei Auflichtbeobachtung

Bei der Auflichtuntersuchung reflektierender Präparate, deren Hauptanwendungsgebiet die Metallografie ist, stellen die üblichen Kontrastierungsmittel, z.B. das Anätzen der geschliffenen und polierten Oberfläche, keinen so erheblichen Mangel wie die mit chemischen Hilfsmitteln durchgeführte Kontrastierung biologischer Präparate dar. Auch die geringe Bildhelligkeit bei der besonders für sehr feine Strukturen, Korngrenzen usw. angewendeten Dunkelfeldbeobachtung ist kein so ernster Nachteil wie im Durchlicht, weil die zu untersuchende tote Materie ohne weiteres die Verwendung starker Lichtquellen und in der Mikrofotografie lange Belichtungszeiten erlaubt. Die Einführung des Phasenkontrastverfahrens war deshalb im Auflicht nicht so zwingend und hat nicht die Bedeutung wie im Durchlicht erlangt.

Trotzdem ist, nachdem sich das Phasenkontrastverfahren im Durchlicht durchgesetzt hatte, besonders von den Metallografen immer stärker die Forderung nach einer solchen Kontrastierungsmethode im Auflicht erhoben worden, vor allem deshalb, weil sich manche Strukturen bestimmter Metallegierungen nur schwer anätzen lassen. Das Phasenkontrastverfahren schien hier neue Perspektiven zu eröffnen. Diese Erwartungen sind wenigstens z.T. erfüllt worden, und heute sind alle größeren Auflichtmikroskope mit einer Phasenkontrasteinrichtung ausgerüstet.

Die Theorie kann dafür direkt vom Durchlicht übernommen werden. Lediglich bei der technischen Durchführung ist auf einige Besonderheiten der Auflichtbeobachtung zu achten.

Auch im Auflicht gibt es Amplituden- und Phasenobjekte, d.h. solche, deren Reflexionsvermögen sich von dem der Umgebung unterscheidet, oder die dem reflektierten Licht relativ zur Umgebung einen Phasenunterschied erteilen.

Im Bild 6.163 wird die optische Wirkung von Amplituden- und Phasenobjekten im Auflicht in Analogie zum Bild 6.5 von Abschn. 6.1.2.1. schematisch dargestellt.

Es falle auf eine ebene, polierte, aus verschiedenen Komponenten bestehende Metalloberfläche eine ebene Welle *EW* ein. Senkrecht zur Fortpflanzungsrichtung dieser Welle herrschen also überall gleiche Phase und Amplitude, was durch Vektoren gleicher Länge und Richtung angedeutet ist. Nach Reflexion an einer ideal ebenen und homogenen Oberfläche entsteht wieder eine ebene Welle *RW*. Sind jedoch irgendwelche Bestandteile eingelagert, die sich in ihren optischen Eigenschaften von der Umgebung unterscheiden, dann ist die reflektierte Welle deformiert, weil ein Teil des Lichts an diesen Bestandteilen, den Amplituden- und Phasenobjekten, gebeugt und in Phase oder Amplitude relativ zur Umgebung geändert wird. Die der reflektierten Welle zugeordneten Vektoren geben durch Richtung und Betrag die relativen Phasen und Amplituden unmittelbar nach der Reflexion wieder.

Wie im Durchlicht hat ein reines Amplitudenobjekt nur die Amplitude, ein reines Phasenobjekt nur die Phase geändert. Von hier ab können die für Durchlicht im Abschn. 6.1.2. durchgeführten Betrachtungen und Ableitungen wörtlich übernommen werden.

Im Bild 6.163 sind zwei in ihrem Charakter unterschiedliche Phasenobjekte eingezeichnet. Das eine, Ph_G, wird als geometrisches, das andere, Ph_P, als physikalisches Phasenobjekt bezeichnet.

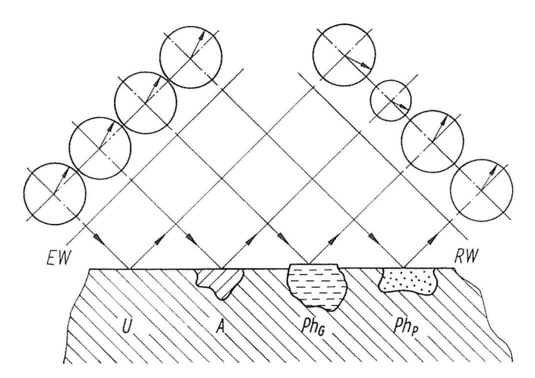


Bild 6.163. Schematische Darstellung der optischen Wirkung von Amplituden- und Phasenobjekten im Auflicht

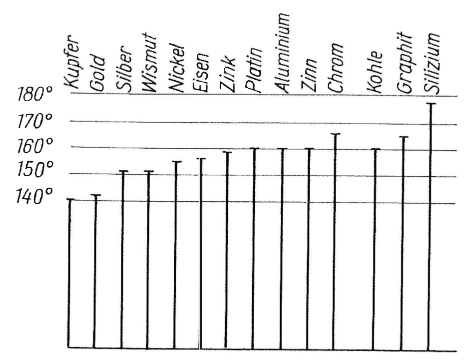


Bild 6.164. Berechnete Phasensprünge bei Reflexion an verschiedenen Metallen und Nichtmetallen bei senkrechtem Lichteinfall und einer Lichtwellenlänge von 589 nm, berechnet nach den in den Tafelwerken angegebenen optischen Konstanten für kompaktes Material

Es kann bei Oberflächenuntersuchungen von Bedeutung sein, diese beiden wohl zu unterscheiden. Geometrische Phasenobjekte sind die, die sich nur durch ihre Geometrie, also durch Höhenunterschiede von der Umgebung unterscheiden, während die optischen Eigenschaften mit denen der Umgebung übereinstimmen. Bei physikalischen Phasenobjekten ist es umgekehrt; sie liegen mit der Umgebung in gleicher Ebene, unterscheiden sich aber durch ihre optischen Eigenschaften. Darunter ist folgendes zu verstehen:

Bei Reflexion an optisch dichteren Medien, (höhere Brechzahl) erleidet das Licht einen Phasensprung (z.B. von 180° bei Nichtleitern, wie Glas). Bei Leitern, wie sie die Metalle darstellen, hängt dieser Phasensprung von der Brechzahl und der Leitfähigkeit des Metalls ab und ist $< 180°$.

Vom Verfasser sind für verschiedene Metalle und Nichtmetalle die Phasensprünge berechnet und im Bild 6.164 dargestellt worden. Sie hängen von der Wellenlänge des Lichts, dem Einfallswinkel und bei schrägem Lichteinfall von der Polarisationsrichtung des Lichts ab. Über einige experimentelle Untersuchungen zu diesem Problemkreis ist in [437] berichtet worden. Auf die Messung der Phasensprünge wird im Abschn. 6.2.3. noch genauer eingegangen.

6.2.2.2. Technische Realisierung der Phasenkontrastuntersuchungen im Auflicht

Bei der technischen Realisierung der Phasenkontrastuntersuchungen im Auflicht geht man, wie im Durchlicht, von der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung aus.

Soll die Köhlersche Beleuchtungsanordnung bei Auflichtphasenkontrast verwirklicht werden, so ist die erforderliche Ringblende in die Nähe der Aperturblende zu setzen. Ihr Bild liegt dann in der Brennebene des Objektivs und übt dort die gleiche Funktion wie die Ringblende bei Durchlichtphasenkontrast aus. Es wird durch die auf unendlichen Bildabstand korrigierten Auflichtobjektive, nach Reflexion der abbildenden Strahlen an der Probenoberfläche, an der gleichen Stelle und in gleicher Größe abgebildet. Das Phasenplättchen müßte also ebenfalls an dieser Stelle liegen. Das würde aber andererseits bedeuten, daß schon beleuchtungsseitig alles Licht durch den Phasenring gehen müßte. Ein normaler Phasenring läßt aber nur den kleineren Teil des auftreffenden Lichts hindurch; der größere Teil wird reflektiert. Hieraus würde eine störende Verschleierung des Bilds resultieren. Es gibt jedoch verschiedene Möglichkeiten zur Vermeidung oder zur starken Reduzierung dieses Streulichts, von denen einige der wichtigsten beschrieben werden sollen. Man kann das Phasenplättchen entweder aus dem Beleuchtungsstrahlengang entfernen, d.h. ein Ringblendenbild hinter dem Beleuchtungsplanglas erzeugen, wo das Phasenplättchen angeordnet wird, oder dieses selbst so ausführen, daß Reflexlicht weitgehend vermieden wird. Für beide Fälle werden je zwei Beispiele beschrieben.

Im ersten Fall ist unter Beibehaltung der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung eine Zwischenabbildung erforderlich (Bild 6.165).

Die Lichtquelle *1* wird durch die Kollektorlinse *2* auf die Ringblende *3* abgebildet. Die Feldlinse *5* erzeugt in der Objektivbrennebene ein erstes Bild der Ringblende und im Unendlichen ein Bild der Leuchtfeldblende *4*, das durch das Objektiv *8* in die Objektebene *9* abgebildet wird, also das ausgeleuchtete Dingfeld begrenzt. Die erste Linse *10* des Zwischenabbildungssystems erzeugt vom Objekt ein erstes Zwischenbild, das noch ein Hellfeldbild ist, und bei *12* ein drittes Bild der Ringblende *3*, in dem das Phasenplättchen angeordnet werden kann. Die zweite Linse des Zwischenabbildungssystems *13* liefert als zweites Zwischenbild des Objekts das gewünschte Phasenkontrastbild, das mit dem Okular beobachtet werden kann.

Eine solche Anordnung liefert ein gleichmäßig ausgeleuchtetes, nach Belieben durch die verstellbare Leuchtfeldblende begrenztes Leuchtfeld. Es sind keine speziellen Phasenkontrastobjektive erforderlich, sondern es wird mit normalen Hellfeldobjektiven gearbeitet, weil Ringblende und Phasenplättchen nach Wunsch ein- und ausgeschaltet werden können. Außerdem kommt man bei nahezu optimaler Ausnutzung der Beleuchtungsapertur mit nur einer Ringblende und einem einzigen Phasenplättchen aus, da ihr zweites Bild die gleiche Größe wie das erste hat. Die günstigste Nutzung der Beleuchtungsapertur hängt bei unveränderter Größe des ersten Ringblendenbilds von der Größe der Objektivpupille ab. Diese ist im allgemeinen für die schwachen und starken Objektive nicht gleich, liegt aber doch in der glei-

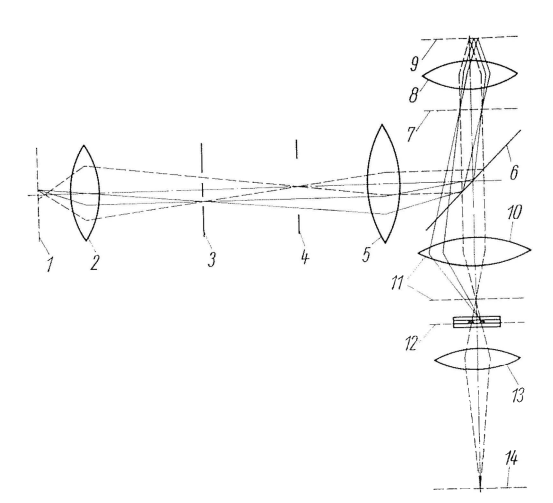


Bild 6.165. Optisches Schema zur Realisierung des Phasenkontrastverfahrens im Auflicht mit Zwischenabbildung

1 Lichtquelle; *2* Kollektor; *3* Ringblende; *4* Leuchtfeldblende; *5* Feldlinse; *6* Planglas; *7* 1. und 2. Bild der Ringblende; *8* Objektiv; *9* Objektebene; *10* 1. Linse des Zwischenabbildungssystems; *11* 1. Zwischenbild; *12* 3. Bild der Ringblende, Phasenplättchen; *13* 2. Linse des Zwischenabbildungssystems; *14* 2. Zwischenbild

chen Größenordnung. Die optimale Nutzung der Beleuchtungsapertur bei den starken Objektiven führt bei gleicher Größe des Phasenplättchens zu einer etwas weniger günstigen Ausnutzung der Beleuchtungsapertur bei den schwachen Objektiven. Das ist jedoch für die Bildwirkung nur von untergeordneter Bedeutung.

Neben den angeführten Vorteilen der Zwischenabbildung sind natürlich auch Nachteile vorhanden. Entweder muß man das Zwischenabbildungssystem unbequem lang machen oder zum Auskorrigieren einen erheblichen Aufwand treiben. Es besteht in diesem Fall immer die Gefahr, besonders durch das an den zusätzlichen Linsenflächen hervorgerufene Streulicht, an Bildqualität zu verlieren.

Eine einfache Möglichkeit ohne Zwischenabbildung ergibt sich, wenn man etwas, jedoch nicht mehr als unbedingt erforderlich, von der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung abgeht [436]. Es wird eine Bildversetzungslinse in den Beleuchtungsstrahlengang gebracht, die das erste Bild der Ringblende näher an die Objektebene heranbringt, so daß ihr zweites Bild hinter dem Planglas liegt (Bild 6.166). An dieser Stelle wird dann das Phasenplättchen angeordnet. Der Abbildungsstrahlengang bleibt also gegenüber Hellfeld unverändert. Außer dem Phasenplättchen sind keine zusätzlichen optischen Elemente vorhanden, die zu einer Minderung der Bildqualität Anlaß geben könnten. In diesem Fall sind auch keine besonderen Phasenkontrastobjektive erforderlich. Es muß an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, daß es für das Prinzip des Phasenkontrastverfahrens nicht entscheidend ist, ob das Phasenplättchen in der Brennebene des Objektivs oder einer ihr konjugierten Ebene angeordnet ist oder nicht. Es ist nur erforderlich, daß es sich an der Stelle eines hinter dem Objektiv befindlichen Bilds der Ringblende befindet. Mit der zuletzt beschriebenen Variante sind wegen des Abgehens von der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung auch Nachteile verbunden, die gegenüber den Vorteilen abgewogen werden müssen. Zunächst ist die Gefahr einer ungleichmäßigen Ausleuchtung des Dingfelds vorhanden; denn wenn das erste Ringblendenbild zu stark der Probenoberfläche genähert wird, kann die Ringblende durchschlagen, was zu einer ringförmigen Aufhellung im Dingfeld führt. Außerdem ist für jedes Objektiv eine besondere Bildversetzungslinse erforderlich, damit die Ringblende stets an der gleichen Stelle abgebildet wird. Die Größe des Ringblendenbilds hängt dann auch von dem jeweiligen Objektiv ab. Zu jedem Objektiv gehört also ein besonderes Phasenplättchen.

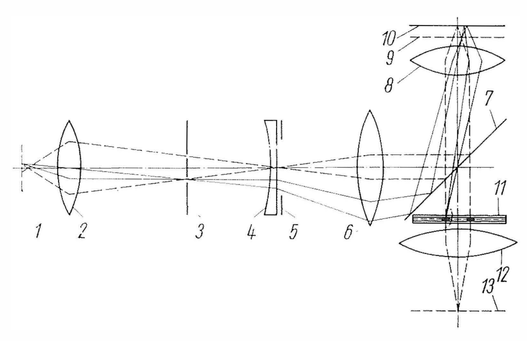


Bild 6.166. Phasenkontrast im Auflicht mit Bildversetzungslinse

1 Lichtquelle; *2* Kollektor; *3* Ringblende; *4* Versetzungslinse; *5* Leuchtfeldblende; *6* Feldlinse; *7* Planglas; *8* Objektiv; *9* 1. Bild der Ringblende; *10* Objektebene; *11* 2. Bild der Ringblende, Phasenplättchen; *12* Tubuslinse; *13* Zwischenbild

Im zweiten der beiden unterschiedenen Fälle werden spezielle Phasenkontrastobjektive verwendet, die Phasenplättchen also im Beleuchtungsstrahlengang belassen und das Reflexlicht auf andere Weise unterdrückt. Das kann z. B. durch einen besonders eingefärbten, stark absorbierenden und schwach reflektierenden Phasenbelag oder mit polarisationsoptischen Hilfsmitteln geschehen, indem das einfallende Licht linear polarisiert und die phasendrehende Schicht so ausgebildet wird, daß das am Objekt reflektierte Licht nach Passieren des Phasenplättchens in der Schwingungsrichtung um 90° gedreht ist und somit den im Abbildungsstrahlengang hinter dem Phasenplättchen angeordneten, zum Polarisator gekreuzten Analysator passieren kann. Das am Phasenplättchen reflektierte Licht behält seine Schwingungsrichtung bei und wird deshalb vom Analysator zurückgehalten.

Eine weitere Möglichkeit zur Beseitigung dieses Reflexlichts besteht in einer besonderen Formgebung des Phasenplättchens und der dazu konjugierten Aperturblende. Der Phasenbelag wird im Bild 6.167 a oder b sektorenförmig mit einer ungeraden Anzahl von Sektoren angeordnet und die Blende entsprechend ausgeführt. Da das beleuchtungsseitig in der hinteren Objektivbrennebene erzeugte Blendenbild spiegelbildlich in die gleiche Ebene abgebildet wird, ist es immer möglich, das erste Blendenbild so zu legen, daß das Licht beleuchtungsseitig durch den belegungsfreien Bereich des Phasenplättchens geht und das zweite Blendenbild vom Phasenbelag vollständig

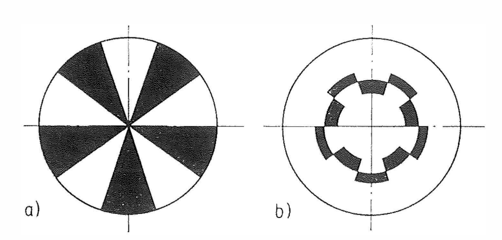


Bild 6.167. Sektorenförmige Phasenplättchen zur Realisierung des Phasenkontrastverfahrens im Auflicht unter Einhaltung der Köhlerschen Beleuchtung ohne Zwischenabbildung

überdeckt wird, womit alle Bedingungen für die Phasenkontrastabbildung erfüllt sind.
Im Fall a), bei vollen Sektoren, kann man ohne Schwierigkeiten mit der Apertur-Irisblende die Beleuchtungsapertur nach Belieben variieren. Der Fall b) gleicht sich besser an die Ringblendenbeleuchtung mit ihren besonderen Vorteilen an, die vor allem darauf beruhen, daß alle Beleuchtungsstrahlen ungefähr unter dem gleichen Winkel auf die Objektoberfläche auftreffen. Bei starken Objektiven, bei denen die Austrittspupille innerhalb des Linsensystems liegt, sind dafür natürlich spezielle Phasenkontrastobjektive erforderlich.

6.2.2.3. Phasenkontrasteinrichtungen im Auflicht

Von den mit Phasenkontrasteinrichtungen ausgerüsteten Auflichtmikroskopen seien nur einige typische Vertreter herausgegriffen. Als eines der ersten industriell hergestellten Geräte dieser Art ist das MEF von Reichert, Wien, (Bild 6.168) zu nennen [440]. Es arbeitet nach der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung mit einem Zwischenabbildungssystem nach Bild 6.165, das seitlich an das Mikroskop angesetzt wird.
Das große Auflichtkameramikroskop NEOPHOT des VEB Carl Zeiss JENA [436] und sein Nachfolger NEOPHOT 2 (Bild 4.34) sowie das vom gleichen Herstellerwerk gefertigte Universalforschungsmikroskop NU und sein Nachfolger Nu 2 (Bild 4.31) verwendeten zunächst das mit Bildversetzungslinse nach Bild 6.166 arbeitende Prinzip. Die notwendigen Ringblenden, Bildversetzungslinsen und Phasenplättchen werden entweder nachträglich angesetzt oder sind z. T. im Gerät eingebaut. Alle bisher genannten Phasenkontrastanordnungen arbeiten mit normalen Hellfeldobjektiven.
Das Metallmikroskop MM 5 von Leitz, Wetzlar, ist für Phasenkontrastbeobachtung mit speziellen Phasenkontrastobjektiven ausgerüstet, in deren hinterer Brennebene sich, wie im Durchlicht, ringförmige Phasenplättchen befinden. Das an den Phasenringen auftretende Reflexlicht wird durch einen speziellen Phasenbelag unterdrückt, so daß die Köhlersche Beleuchtung beibehalten werden kann.
Das NEOPHOT 2 des VEB Carl Zeiss JENA arbeitet neuerdings ebenfalls mit speziellen Phasenkontrastobjektiven nach dem Prinzip von Bild 6.167.

6.2.2.4. Dunkelfeldanordnungen

Es kann auch im Auflicht die Theorie der Dunkelfeldabbildung aus der des Phasenkontrastver-

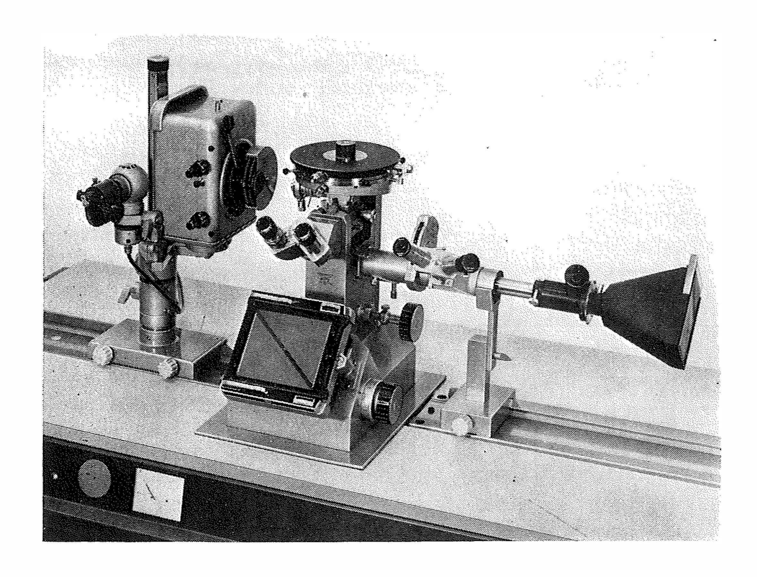


Bild 6.168. Metallmikroskop MEF von Reichert mit Zwischenabbildungssystem für Phasenkontrast und angesetzter Interferenzkontrasteinrichtung
Firma C. Reichert, Wien, Werkfoto

fahrens abgeleitet werden, indem man den Grenzfall betrachtet, wo der Phasenring undurchsichtig ist und damit alles direkte Licht zurückhält. Eine solche Dunkelfeldanordnung, die im Durchlicht noch brauchbar ist, führt im Auflicht kaum zum Erfolg. Denn bei Durchgang der Beleuchtungsstrahlen durch das Objektiv würde durch Reflexion an den Linsenflächen immer ein erheblicher Anteil von Streulicht auftreten, der zu einer Aufhellung des Bildfelds führt und damit die Erkennbarkeit feiner Einzelheiten deutlich verschlechtert.

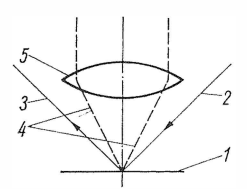


Bild 6.169. Einseitig schräge Beleuchtung zur Realisierung der Dunkelfeldbeobachtung

1 Objektebene; *2* einfallendes Licht; *3* reflektiertes Licht; *4* gebeugtes Licht; *5* Objektiv

Zu einem wirklichen Dunkelfeld gelangt man im Auflicht nur durch schräge Beleuchtung des Objekts, im einfachsten Fall wie im Bild 6.169, in dem die einseitig schräge Beleuchtung dargestellt ist. In diesem Fall gehen die an einer homogenen, senkrecht zur optischen Achse ausgerichteten Probenoberfläche reflektierten Beleuchtungsstrahlen seitlich am Objektiv vorbei. Nur das an kleinen Struktureinzelheiten gebeugteoder ankleinen, gegen die optische Achse geneigten Flächenelementen reflektierte Licht kann ins Objektiv gelangen. Die einseitige Dunkelfeldbeleuchtung wird jedoch nur für geringe Ansprüche und schwache Objektive verwendet. Bei stärkeren Objektiven ist es aus Gründen der Bildhelligkeit und -qualität besser, eine allseitig schräge Beleuchtung zu verwenden. Im Bild 6.170 wird die schematische Darstellung einer solchen Dunkelfeldanordnung wiedergegeben.

Die Lichtquelle *1* wird durch den Kollektor *2* in die als Leuchtfeldblende wirkende, in der Brennebene der Kollimatorlinse *5* liegende Blende *4* abgebildet. Das von jedem Punkt des Lichtquellenbilds ausgehende Licht verläßt die Kollimatorlinse als paralleles Bündel, von dem durch die Dunkelfeldblende *6* ein röhrenförmiger Teil ausgeblendet wird und über den als Dunkelfeldkondensor wirkenden Parabolspiegel *8* auf die Präparatoberfläche *9* gelangt. Da die zwischen *5* und *8* achsenparallelen Strahlen im Brennpunkt der Parabel vereinigt werden, wird die Lichtquelle in die Objektebene *9* abgebildet, wenn der Parabelbrennpunkt in diese Ebene gelegt wird, also mit dem Brennpunkt des Objektivs zusammenfällt. Die etwas geneigt gegen die optische Achse verlaufenden Beleuchtungsbündel vereinigen sich nicht mehr streng in einem Punkt, doch sind sie immerhin noch in der Lage, in der Nähe der optischen Achse eine Abbildung der Leuchtfeldblende zu vermitteln, so daß mit ihr die Größe des beleuchteten Felds variiert werden kann.

Bei dieser Dunkelfeldanordnung wird also nicht die Köhlersche Beleuchtung, sondern die sog. *critical illumination* angewendet, deren Hauptmerkmal die Abbildung der Lichtquelle in die Objektebene ist. Für eine Dunkelfeldanordnung, wo die kontinuierliche Änderung der Beleuchtungsapertur kaum einen Gewinn bringt, ist diese Beleuchtungsart wegen der günstigeren Lichtausbeute der Köhlerschen Beleuchtung überlegen. Zur Vermeidung der bei Verwendung einer Glühlampe eventuell vorhandenen ungleich-

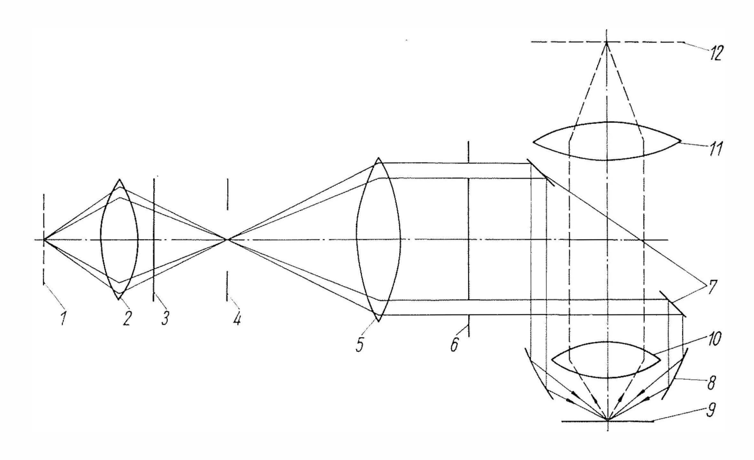


Bild 6.170. Schematische Darstellung einer Dunkelfeldanordnung für allseitig schräge Beleuchtung

1 Lichtquelle; *2* Kollektor; *3* Mattglas; *4* Leuchtfeldblende; *5* Kollimatorlinse; *6* Dunkelfeldblende; *7* Ringspiegel; *8* Parabolspiegel; *9* Objektebene; *10* Objektiv; *11* Tubuslinse; *12* Zwischenbild

mäßigen Ausleuchtung des Felds und zur Vergrößerung des ausgeleuchteten Teils desselben kann in der Nähe der Kollektorlinse *2* ein Mattglas *3* eingeschaltet werden.
Das von jedem einzelnen Objektpunkt im wesentlichen durch Beugung ins Objektiv *10* gelangende Licht geht als Parallelbündel durch den durchbohrten Ringspiegel *7* und wird mit der Tubuslinse *11* in der Bildebene *12* wieder in einem Punkt vereinigt. Bei Verwendung einer starken Lichtquelle sind so alle Bedingungen erfüllt, die an eine gute Dunkelfeldabbildung gestellt werden müssen.
Im Bild 6.171 wird der Dunkelfeldkondensor nach Bild 6.170 am Universalforschungsmikroskop NU gezeigt.

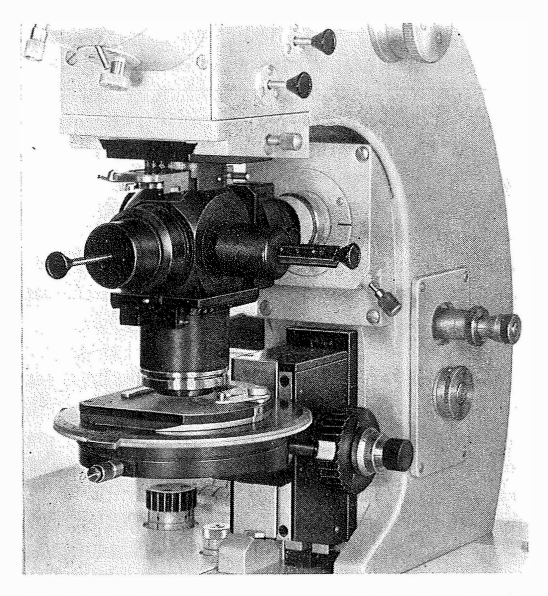


Bild 6.171. Dunkelfeldkondensor mit Parabolspiegel nach Bild 6.170 am NU
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

6.2.2.5. Anwendungen

Das Hauptanwendungsgebiet der Auflichtphasenkontrastmikroskopie ist die Metallografie. Das Verfahren kann jedoch bei ausreichendem Reflexionsvermögen auch für die Untersuchung ebener, nichtmetallischer Oberflächen verwendet werden. Bei geschliffenen und polierten Metalloberflächen unterscheidet sich das Reflexionsvermögen der verschiedenen Legierungsbestandteile zu wenig, um im Hellfeld durch unterschiedliche Helligkeit sichtbar zu werden. Zunächst ist die Struktur durch Anätzen der Probenoberfläche zu entwickeln.
Bei heterogenem Material sind auch vor dem Anätzen Unterschiede in der Probenoberfläche vorhanden, die optisch meist nicht zu erkennen sind. Die Legierungsbestandteile eines Metalls haben unterschiedliche Härte, wodurch beim Schleif- und Polierprozeß Höhenunterschiede, also geometrische Phasenobjekte Ph_G nach Bild 6.163 auftreten, oder es ist eine Differenz des schon erwähnten Phasensprungs bei der Reflexion vorhanden, was den physikalischen Phasenobjekten Ph_p entspricht.
Beide Objektarten können im Phasenkontrast sichtbar gemacht werden. Daraus leitet sich die Möglichkeit ab, durch Einführung des Phasenkontrastverfahrens das Anätzen der Probe zu ersparen, zumal sich bei manchen Metallegierungen eine Differenzierung der Gefügebestandteile durch Anätzen nur schwer erreichen läßt. Darüber hinaus könnte man auch bei geätzten Schliffen noch zusätzlich Höhenunterschiede an nicht geätzten Gefügebestandteilen sichtbar machen.
Die an die Phasenkontrastbeobachtung im Auflicht gestellten Erwartungen haben sich jedoch nicht restlos erfüllt. Die erste Schwierigkeit besteht in der Präparierung. Denn bei der Anfertigung der Schliffe sind äußerste Sorgfalt und Sauberkeit erforderlich. Ein im Hellfeld guter Schliff kann für Phasenkontrastbeobachtung unbrauchbar sein. Die Oberfläche des Schliffs muß eben sein, damit die Abbildung des Blendenrings nicht gestört wird, und darf keinerlei Reste von Poliermitteln oder Verdunstungsrückstände aufweisen. Zur Säuberung des Schliffs kann es manchmal zweckmäßig sein, diesen ganz leicht anzuätzen. Auch darf die Polierzeit nicht zu lang sein, damit kein zu starkes Relief entsteht, das die Ringblendenabbildung erheblich stören würde.
Die zweite Schwierigkeit besteht in der Deutung des Phasenkontrastbilds. Hier ist ein Umdenken erforderlich; denn die Metallografen hatten bis zur Einführung des Phasenkontrastverfahrens ihre reichen Erfahrungen fast ausschließlich an Bildern geätzter Oberflächen gesammelt. Mit den Phasenkontrastbildern mußte man erst vertraut werden. Erschwerend kommt noch hinzu, daß bei großen relativen Phasendrehungen aus dem Kontrast nicht eindeutig auf die Größe und, wegen der schon im Abschn. 6.1.2. beschriebenen Inversion, nicht einmal auf das Vorzeichen der Phasendrehung geschlossen werden kann.
Aus den genannten Gründen sind die Metallografen nur zögernd an die breitere Anwendung

des Phasenkontrastverfahrens herangegangen. Es wird zwar für Forschungsarbeiten z.T. sehr geschätzt, doch mit ihm durchgeführte wissenschaftliche Arbeiten sind kaum bekannt geworden. Die zu diesem Thema erschienenen Veröffentlichungen verfolgten im wesentlichen den Zweck, die von den verschiedenen Herstellern entwickelten Auflichtphasenkontrasteinrichtungen bekanntzumachen und Anwendungsbeispiele für ihren zweckmäßigen Einsatz zu geben.

Cuckow [438] untersucht einen wärmebehandelten Stahl. Besonders hervorgehoben wird gegenüber der geätzten und der elektronenmikroskopischen Aufnahme das deutliche Erkennen eines Zwischengefüges neben dem Martensit.

McLean [444] gibt einen Erfahrungsbericht über die Verwendung des Phasenkontrastmikroskops zum Studium metallischer Oberflächen. Der Verfasser weist auf die große Empfindlichkeit des Phasenkontrastverfahrens zur Erkennung von Höhenunterschieden hin, auch solcher, die das Interferenzmikroskop bei weitem nicht mehr sichtbar machen kann. Es wird ein Linearitätsbereich der Intensität in Abhängigkeit vom Höhenunterschied von etwa 1nm bis zu einigen 10 nm angegeben. Diese Abschätzung wurde aufgrund der im Phasenkontrast sichtbaren Gleitlinien an dem Bild eines Lagermetalls durchgeführt. Zur Vermeidung von Zweideutigkeiten hält er es manchmal für zweckmäßig, die Proben nacheinander im positiven und negativen Phasenkontrast zu untersuchen. Gerade in der bei kleinen Phasendrehungen eindeutigen Entscheidungsmöglichkeit, ob es sich bei den Objektdetails um Erhöhungen oder Vertiefungen handelt, liegt der große Vorteil der Phasenkontrastbeobachtungen von Metalloberflächen gegenüber der Hellfeldbeobachtung. Das Phasenkontrastverfahren kann auch für Deformationsstudien verwendet werden, weil sich bei Deformation des Materials (z. B. durch Erhitzung) auch die Oberfläche ändert.

An drei Phasenkontrastaufnahmen der gleichen Stelle eines Martensit-Bainit-Gefüges und einer Magnesium-Mangan-Legierung, die unterschiedlich geätzt wurden, wird die Phasenkontrastwirkung demonstriert.

Perryman und *Lack* [447] kommen bei ihren Untersuchungen über die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens im wesentlichen zum gleichen Ergebnis wie *McLean*. Als Routineverfahren wird es sich kaum einführen, stellt aber ein zusätzliches wichtiges Hilfsmittel für die Forschung dar. Die Autoren weisen auf die Schwierigkeit hin, zwischen geometrischen und physikalischen Phasenobjekten zu unterscheiden. Zur Klärung dieser Frage wird vorgeschlagen, die Oberfläche mit Silber zu bedampfen, weil dann nur noch die Höhenunterschiede wirksam sind. Elektrolytisch polierte Oberflächen homogenen Materials werden, im Gegensatz zu meinen eigenen Erfahrungen, für die Phasenkontrastbeobachtung als besonders günstig angesehen. Untersucht wurden gegossenes Büchsenmetall, reines Kupfer, Aluminium und Zink, Kupferoxidteilchen in Kupfer, eine Aluminium-Magnesium-Legierung, Alpha-Messing und eine Kupfer-Nickel-Legierung. Weitere Arbeiten zur Auflichtphasenkontrastmikroskopie sind dem Literaturverzeichnis zu entnehmen.

Untersuchungen von Metalloberflächen können aber auch im Durchlichtphasenkontrast durchgeführt werden, wenn man sich der Lackabdruckmethode bedient [439]. Vom Verfasser ist diese Methode zu einer kombinierten Auflicht-und Durchlichtuntersuchung der gleichen Metalloberfläche benutzt worden, um eventuell experimentell zu klären, inwieweit die theoretisch zu erwartenden Phasensprünge nach Bild 6.164 auch praktisch auftreten [437]. Wegen der allgemeineren Bedeutung dieser Untersuchung für die Phasenkontrastbeobachtung von Auflichtobjekten soll darauf etwas genauer eingegangen werden. Die zu untersuchende Metallprobe wurde zunächst sorgfältig geschliffen und poliert, aber nicht oder nur schwach geätzt, und jeweils eine Aufnahme im Hellfeld und Phasenkontrast angefertigt, erstere nur, um die Amplitudenobjekte deutlich zu erkennen. Anschließend wurde von der Metallprobe ein Lackabzug hergestellt und zunächst im Durchlichtphasenkontrast und nach Metallbelegung der Abdruckfläche im Auflichtphasenkontrast nach folgendem Schema (Bild 6.172) untersucht.

In a) und b) ist schematisch die gleiche Probenoberfläche dargestellt worden, die ein positives und ein negatives geometrisches Phasenobjekt sowie

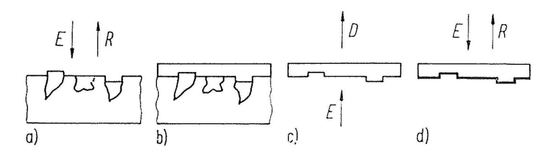


Bild 6.172. Schematische Darstellung der Untersuchung von Oberflächen nach dem Lackabdruckverfahren

a) freie Probenoberfläche mit negativem und positivem geometrischem sowie physikalischem Phasenobjekt;
b) mit Lackschicht versehene Probenoberfläche;
c) unbedampfter Lackabzug;
d) Lackabzug
mit auf der Abdruckfläche aufgedampftem Metallbelag

ein sog. physikalisches Phasenobjekt enthält. Bei ausreichender Phasenänderung relativ zur Umgebung müßten bei direkter Beobachtung alle drei Phasenobjekte heller oder dunkler als die Umgebung erscheinen. Im Lackabdruck c) und d) muß natürlich das physikalische Phasenobjekt verschwinden, weil dieser aus homogenem Material besteht und sich nur Höhenunterschiede einprägen. Alle Phasenobjekte, die in a), aber nicht in c) oder d) vorhanden sind, müßten also physikalische Phasenobjekte sein. Die Untersuchung der gleichen Lackabdrücke c) und d), einmal belegt und einmal unbelegt, ergibt einige neue Gesichtspunkte und wird deshalb etwas genauer behandelt.

Die Abzüge wurden ausschließlich aus Zaponlack angefertigt, dessen Brechzahl bei etwa 1,5 liegt. Die Höhen h der Phasenobjekte sind in der Probenoberfläche und dem Lackabdruck gleich, wenn man von einer geringen Deformation beim Trocknen und durch das Einspannen der Lackfolie absieht. Die durch das Objekt hervorgerufene Phasendrehung ist für a)

$$\varphi_a = 2h/\lambda_0\, 360°,$$

weil die Strahlen der Umgebung die Höhe h zweimal durchlaufen und das umgebende Medium Luft mit der Brechzahl 1 ist. Bei c) muß der nur einmal durchlaufene Weg h noch mit der Brechzahldifferenz gegen Luft multipliziert werden. Für diesen Fall beträgt die relative Phasendrehung

$$\varphi_c = h/\lambda_0\,(n-1)\,360° = 0{,}5\; h/\lambda_0\, 360° = 1/4\,\varphi_a,$$

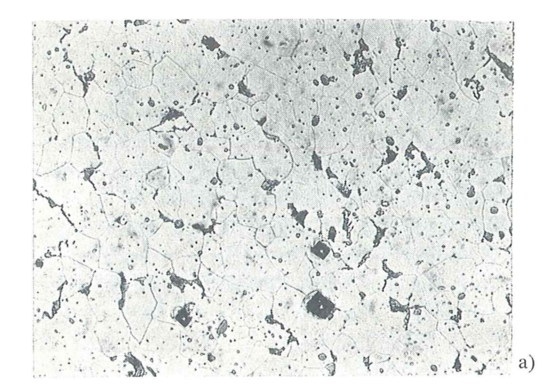
also nur 1/4 von der des Falls a). Es ist demnach eine wesentlich geringere Empfindlichkeit vorhanden. Hinzu kommt noch, daß man nicht in jedem Fall die Rückseite der Folie als ideal eben ansehen kann, so daß im Durchlichtphasenkontrast noch Strukturen ins Bild kommen können, die nichts mit der Probenoberfläche zu tun haben. Beide Nachteile werden durch Aufdampfen einer gut reflektierenden, undurchsichtigen Metallschicht nach dem Schema von Bild 6.172 d behoben. Für die relative Phasendrehung gilt im wesentlichen wieder die Gleichung für φ_a, nur mit dem einen Unterschied, daß anstelle der Wellenlänge in Luft λ_0 die Wellenlänge λ_n in der Schicht mit der Brechzahl n einzusetzen ist.

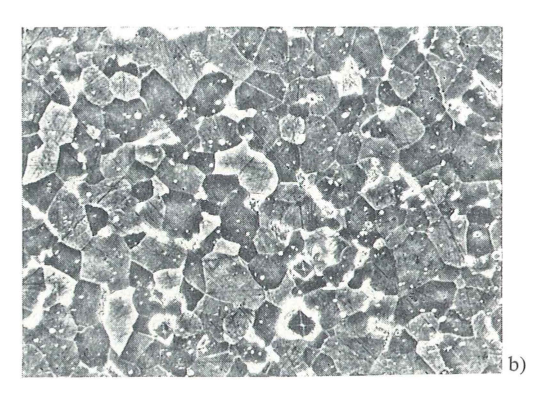
$$\varphi_d = 2h/\lambda_n\, 360° = n\, 2h/\lambda_0\, 360° = 1{,}5 \cdot 2h/\lambda_0\, 360°.$$

Die Anordnung d) müßte also 1,5mal empfindlicher als a) und 6mal empfindlicher als c) sein.

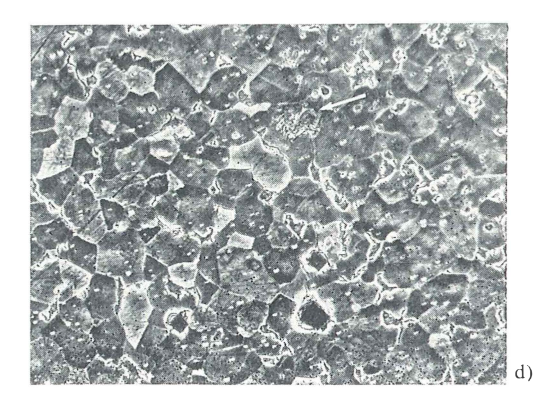
Der Faktor 1,5 zwischen a) und d) ist zu gering, um in der Praxis dadurch begründete deutliche Kontrastunterschiede wahrzunehmen. Der Faktor 4 zwischen c) und a) bzw. 6 zwischen c) und d) macht sich jedoch, wie im Bild 6.173 zu ersehen ist, in Form einer auffallenden Kontrastverstärkung bemerkbar. Es wurden auf diese Weise eine Anzahl verschiedener Metallproben untersucht; doch in keinem dieser Fälle konnte ein eindeutiger Nachweis für das Vorhandensein physikalischer Phasenobjekte erbracht werden. Die durchgeführten Untersuchungen sind aber noch in anderer Hinsicht interessant. Aus diesem Grund sei Bild 6.173, das ein ausgewähltes Beispiel darstellt, etwas genauer erläutert.

Die Bilder 6.173 a und b bringen die Darstellung eines schwach angeätzten Schliffs von Schnellautomatenweichstahl mit der Bezeichnung 9S20K, und zwar a) im Hellfeld und b) im Auflichtphasenkontrast; c) bringt einen Lackabdruck der Probenoberfläche im Durchlichtphasenkontrast und d) den gleichen Lackabdruck im Auflichtphasenkontrast nach Aufdampfen einer gut reflektierenden Schicht. Zur besseren Orientierung sind drei Härteeindrücke angebracht worden. Im Hellfeld a) sieht man neben den angedeuteten Korngrenzen als Amplitudenobjekte einige Perlitinseln und Sulfidschlacken, während die Phasenkontrastbilder, besonders b) und d), eine stark differenzierte Struktur zeigen. Die in a) dunklen Amplitudenobjekte sehen in c) hell aus, woraus man zunächst beim Lackabdruck auf eine negative relative Phasendrehung, also in der Probenoberfläche auf eine Erhöhung schließen muß. Dann müßten, bei Beschränkung auf Objektphasendrehungen in der Probenoberfläche von kleiner als 200°, diese Objekte aber auch in d) heller als die Umgebung erscheinen. Das ist jedoch nicht der Fall, und man muß nach einer Erklärung für dieses Phänomen suchen. Eine solche bietet sich durch das Aussehen der Härteeindrücke an, die in c) hell und sonst dunkel erscheinen. Durch den Flankenwinkel der Härteeindrücke wird das Licht abgelenkt. Im Auflicht (Bilder 6.173 a, b und d) ist diese Ablenkung so stark, daß das direkte Licht nicht mehr ins Objektiv gelangt und die Härteeindrücke hierdurch dunkel erscheinen. Im Durchlicht ist die Ablenkung wesentlich geringer. Das direkte Licht wird noch vom Objektiv aufgenommen. Da es jedoch nicht durch den Phasenring geht, erleidet es keine Schwächung, wodurch die Härteeindrücke hell erscheinen. Das gleiche gilt für die Aufwulstungen um die Härteeindrücke in den Bildern 6.173 c und d.


a)


b)


c)


d)

Analog hierzu könnte man sich vorstellen, daß im Auflicht Amplitudenobjekte nicht nur durch vermindertes Reflexionsvermögen, sondern auch aufgrund der an einer etwas aufgerauhten Oberfläche hervorgerufenen Lichtstreuung über den Aperturwinkel des Objektivs hinaus entstehen. Bei dem im Durchlicht beobachteten Abdruck der Probenoberfläche ist der Streuwinkel wesentlich kleiner, so daß sinngemäß das gleiche gilt wie für die Härteeindrücke.
Nachträgliche interferometrische Messungen haben jedoch gezeigt, daß die in diesem Fall auftretenden Objektphasendrehungen größer als 200°, also in c) größer als 50°, in d) größer als 300° sind und demnach die Kontrastumkehr durch Inversion (vgl. Bild 6.15) entsteht. Die Amplitudenobjekte sind also Erhöhungen.
Die im Bereich der Amplitudenobjekte vorhandenen Strukturen sind in d) deutlicher zu erkennen als in b), weil es sich im letzteren Fall um eine Direktabbildung der Oberfläche handelt und das auffallende Licht an den Amplitudenobjekten durch geringeres Reflexionsvermögen stärker geschwächt wird als in d). Diese sind demnach im Phasenkontrast, wie schon im Abschn. 6.1.2.2. näher begründet wurde, stärker aufgehellt, wodurch die feineren Strukturen überdeckt werden. Die nur in c) und d) sichtbaren, in d) durch einen Pfeil markierten Strukturen sind auf eine Verunreinigung im Lackabzug zurückzuführen.

6.2.3. Interferenzmikroskopie (Auflicht)

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

6.2.3.1. Aufgabenbereich und allgemeine Grundlagen

Wenn auch das erste Interferenzmikroskop ein solches für Durchlicht war, hat die Interferenzmikroskopie doch zunächst in erster Linie im Auflicht zur Untersuchung technischer Oberflächen Bedeutung erlangt. Es wurde vor allem eingesetzt, um die Güte feinstbearbeiteter Oberflächen zu beurteilen und z. B. die Anzahl und Tiefe von Kratzern und

Bild 6.173. Wiedergabe der Oberfläche eines Schnellautomatenweichstahls 9S20K
a) im Hellfeld;
b) im Auflichtphasenkontrast, direkt;
c) im Durchlichtphasenkontrast des unbelegten Lackabzugs;
d) im Auflichtphasenkontrast des belegten Lackabzugs (M 250 : 1) [64]

Bearbeitungsspuren festzustellen. Dabei waren keine allzu hohen Vergrößerungen erforderlich, so daß man mit relativ schwachen Objektiven auskam. Heute haben sich mit der Verbreiterung der Anwendungsbereiche auch die an ein solches Gerät zu stellenden Forderungen wesentlich erhöht. Ein neues, großes Anwendungsgebiet hat das Auflichtinterferenzmikroskop in der Dünnschichttechnik, besonders der Mikroelektronik gefunden, wo an kleinsten Elementen genaue Schichtdickenmessungen durchgeführt werden müssen. Daneben gibt es dem Durchlicht äquivalente Interferenzmethoden zur Kontrastierung feinster Struktureinzelheiten. Die grundlegenden Betrachtungen über die Prinzipien der Interferenzmikroskopie und die Durchführung von Gangunterschiedsmessungen können direkt vom Durchlicht, Abschnitte 6.1.3.1. und 6.1.3.2., übernommen werden. Lediglich bei der Bestimmung des Gangunterschieds ist zu beachten, daß sich dieser, abweichend von Gl. (6.8), für senkrechten Lichteinfall ergibt als

$$\Delta = 2dn, \qquad (6.46)$$

wo d die Objekthöhe und n die Brechzahl des umgebenden Mediums, bei Immersionsobjektiven z. B. die Brechzahl des Immersionsmittels sind. Untersucht man ein solches Objekt mit einem

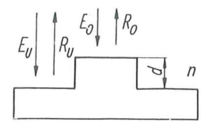


Bild 6.174. Zur Definition des Gangunterschieds bei Auflichtobjekten

Trockenobjektiv, also in Luft, dann ist der Gangunterschied gleich der doppelten Objekthöhe (Bild 6.174)

$$\Delta = 2d, \qquad (6.46\,a)$$

und der Interferenzstreifenabstand entspricht einem Höhenunterschied von $\lambda/2$.

Interferenzanordnungen für Auflicht

Die meisten der bisher entwickelten Auflichtinterferenzmikroskope benutzen das Prinzip des Michelson-Interferometers (Bild 6.175).

Das von der kleinen, monochromatischen Lichtquelle *1* ausgehende Licht verläßt die Kollimatorlinse *2* als Parallellichtbündel, das an der Teilungsfläche *3* in zwei gleiche Anteile aufgespaltet wird. Die Teilbündel gelangen nach Reflexion an

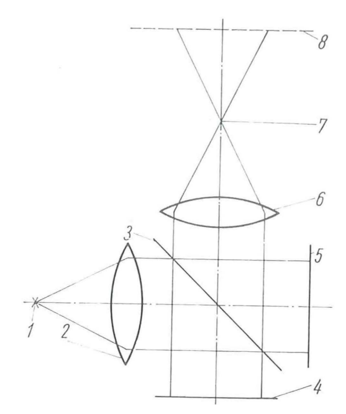


Bild 6.175. Prinzip des Michelson-Interferometers

1 Lichtquelle; *2* Kollimatorlinse; *3* Teilungsfläche; *4* Präparatoberfläche; *5* Vergleichsfläche; *6* Objektiv; *7* Objektivaustrittspupille; *8* Bildebene

der Präparatoberfläche *4* und der Vergleichsfläche *5* wieder zur Teilungsfläche *3*, an der sie erneut in zwei gleiche Anteile aufgespaltet werden. Die gemeinsam in Richtung Objektiv *6* verlaufenden Anteile gelangen über die Austrittspupille *7* des letzteren in die Bildebene *8* und erzeugen hier ein Bild *4'* und *5'* von *4* und *5*. Da beide Strahlenbündel zueinander kohärent sind, interferieren sie in der Zwischenbildebene zu einer Interferenzerscheinung, deren Aussehen vor allem von der Gestalt beider Flächen *4'* und *5'* und ihrer Neigung zueinander abhängt (Bild 6.176). Im allgemeinen entsteht ein System von Interferenzstreifen, deren Abstand um so größer ist, je kleiner man die Neigung zwischen *4'* und *5'* macht. Die Neigung läßt sich entweder durch Schwenken von *4* oder von *5* bzw. einer besonderen, nicht gezeichneten Kompensationsplatte ändern. Im Grenzfall, wenn *4'* und *5'* zueinander parallel sind, erhält man ein homogenes streifenfreies Feld. Unebenheiten in *4* oder *5* machen sich im ersten Fall durch eine Streifenversetzung und im zweiten Fall durch eine Helligkeitsänderung gegenüber der Umgebung bemerkbar. Die Größe der Unebenheiten kann entweder durch die relative Streifenauslenkung oder im homogenen Feld durch Kompensation des Gangunterschieds ermittelt werden. Die Kompensation wird entweder durch Parallelver-

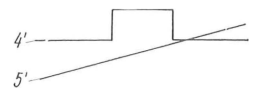


Bild 6.176. Abbildung von Objekt- und Vergleichsfläche 4 und 5 im Michelson-Interferometer

schiebung von *5* oder durch Einführung eines Kompensationskeils, der meist als Doppelkeil ausgeführt ist, realisiert.
Neben dem Michelson-Prinzip sind in letzter Zeit vielfach auch die schon beim Durchlicht beschriebenen Shearingverfahren zur Anwendung gekommen, und zwar sowohl als Kontrastmittel als auch zur Durchführung genauer Gangunterschiedsmessungen.
Schließlich darf die relativ einfach zu realisierende Methode der Vielstrahlinterferenzen nicht unerwähnt bleiben.

6.2.3.2. Interferenzanordnungen, bei denen der Vergleichsstrahlengang vom Objekt nicht beeinflußt wird

Alle nach dem Michelson-Prinzip arbeitenden Interferenzmikroskope können in diese Kategorie eingeordnet werden. Die einfachste Form ist schon bei der Erläuterung des Michelson-Prinzips im Bild 6.176 dargestellt worden. Wegen des zwischen Präparat und Objektiv angeordneten Teilungswürfels kann die Objektivapertur, und damit auch die nutzbare Vergrößerung, nicht sehr groß sein. Für schwache Vergrößerungen werden von verschiedenen Herstellern nach diesem Prinzip arbeitende Interferenzmikroskope angeboten,

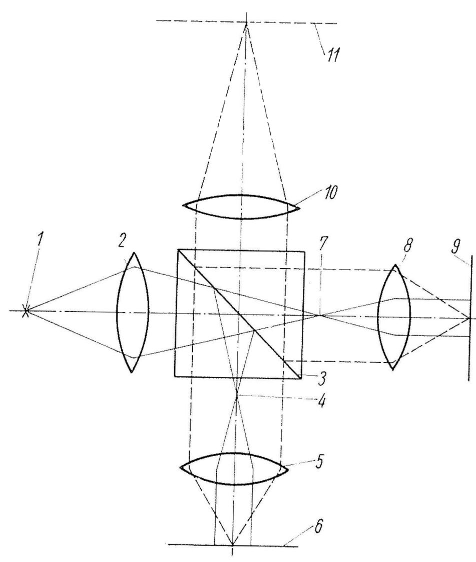


Bild 6.177. Optisches Schema des Auflichtinterferenzmikroskops nach Linnik

1 Lichtquelle; *2* Kollimatorlinse; *3* Teilungsfläche; *4* und *7* Austrittspupillen der Objektive *5* und *8*; *6* Objektebene; *9* Vergleichsfläche; *10* Tubuslinse; *11* Zwischenbildebene

die vorwiegend für Rauhigkeitsmessungen an bearbeiteten Oberflächen eingesetzt werden. Die Auswertung der Interferenzerscheinungen erfolgt nach der Streifenmethode.
Zur Erhöhung der verwendbaren Objektivapertur werden zwei gepaarte Objektive verwendet (Bild 6.177). Eine entsprechende Einrichtung, allerdings mit einem Planglas anstatt des Teilungswürfels, ist zuerst von *Linnik* [461] beschrieben worden. Bei einer solchen Anordnung ist es eher möglich als nach Bild 6.175, zur leichteren Justierung Kompensationsplatten in den Abbildungs- und Vergleichsstrahlengang zu bringen. Man kann auch im Interferenzkontrast arbeiten und mit einem Phasenschieber die Objektphasendrehung messen.
Die Lichtquelle *1* wird mit der Kollimatorlinse *2* über die Teilungsfläche *3* in die gleichzeitig als Eintrittspupillen wirkenden Austrittspupillen *4* und *7* der Objektive *5* und *8* abgebildet. Jeder Lichtquellenpunkt sendet somit ein paralleles Beleuchtungsbündel sowohl auf die Objektebene *6* als auch auf die Vergleichsfläche *9*. Die Objektive sind für unendliche Bildweite korrigiert, so daß im Teilungswürfel die Abbildungsstrahlen parallel verlaufen und das mikroskopische Bild in der Brennebene der Tubuslinse *10* entsteht. Hier überlagern sich Objektwelle und Vergleichswelle und erzeugen das Interferenzbild, das in der üblichen Weise ausgemessen werden kann.
Im Prinzip ist die Verwendung stärkster Objektive möglich. Die Hauptschwierigkeit besteht in der Paarung der beiden Objektive auf möglichst gleichen Korrektionszustand und gleiche Brennweite, da andernfalls kein homogenes Feld zu erreichen ist.
Im Bild 6.178 wird das Auflicht-Interferenzmikroskop der Firma Leitz, Wetzlar, gezeigt. Unmittelbar oberhalb des Objektivs befindet sich der Interferometerteil mit dem verdeckten Vergleichsobjektiv. Gemessen werden die Auslenkungen der Interferenzstreifen, deren Abstand durch Schwenken der Vergleichsfläche variiert werden kann.
Das Auflicht-Interferenzmikroskop von Opton, Oberkochen, arbeitet ebenfalls nach dem Michelson-Prinzip (Bild 6.179). Die Teilstrahlen werden jedoch so geführt, daß es möglich ist, die drei verwendeten Objektivpaare diametral auf einem Revolver anzuordnen, so daß beide Objektive gleichzeitig durch Drehen des Revolvers ausgewechselt werden können. Gangunterschiedsmessungen erfolgen ebenfalls über die Auslenkung der Interferenzstreifen.

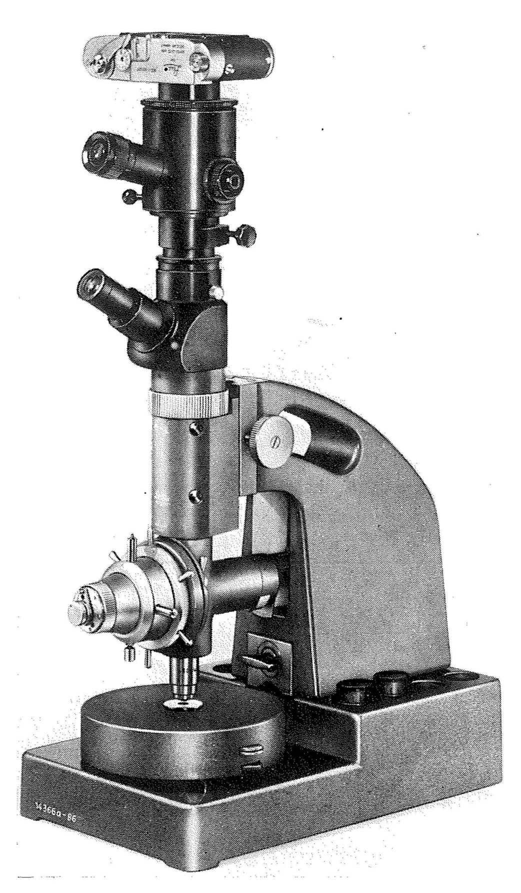
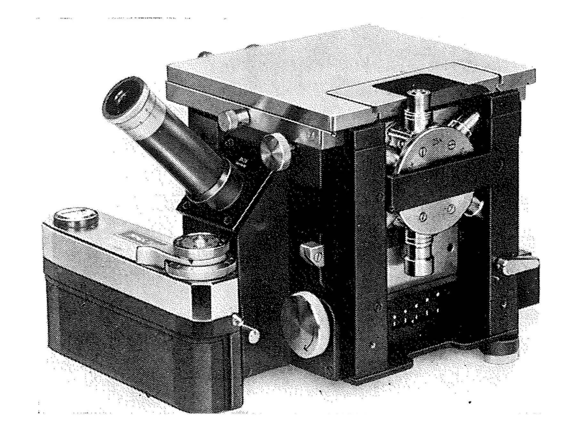


Bild 6.178. Nach dem Michelson-Prinzip arbeitendes Auflichtinterferenzmikroskop
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

Bild 6.179. Auflichtinterferenzmikroskop mit Fotoansatz
Firma Opton, Oberkochen, Werkfoto



Eine andere, einfache Anordnung ist von *Mirau* [462] vorgeschlagen worden (Bild 6.180).
In der Mitte zwischen Objektebene *1* und Objektivfrontlinse befindet sich zwischen zwei verkitteten Glasplättchen die Teilungsfläche *2*, an der die Strahlen aufgespaltet und nach Reflexion an der Präparatoberfläche *1* bzw. dem verspiegelten Fleck *4* der Objektivfrontlinse wieder vereinigt

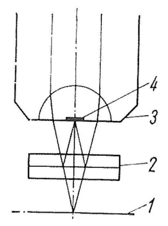


Bild 6.180 Interferenzmikroskopische Anordnung nach Mirau
1 Objektebene; *2* Teilungsfläche; *3* Objektiv; *4* verspiegelter Fleck auf der Objektivfrontlinse

werden. Der Interferenzstreifenabstand kann durch Neigen von *1*, *2* oder *4* variiert werden. Man kann die Anordnung auch so abwandeln, daß sich *4* nicht auf der Frontlinse, sondern auf einer Glasplatte zwischen der Teilungsfläche und dem Objektiv befindet. So ist es leichter möglich, durch Austausch dieser Glasplatte das Reflexionsvermögen von *1* und *4* aufeinander abzustimmen.
Die Interferenzen am reellen Keil haben eine sehr breite Anwendung in der Interferenzmikroskopie gefunden, besonders in Form der Vielstrahlinterferenzen nach *Tolansky* [466]. Man legt nach Bild 6.181 eine halbdurchlässig verspiegelte Glas-

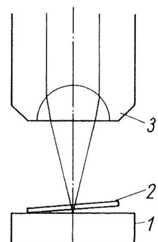


Bild 6.181 Anordnung zum Erzeugen von Keilinterferenzen
1 Objektebene; *2* Vergleichsfläche; *3* Objektiv

platte *2* mit der verspiegelten Seite so auf eine gut reflektierende Oberfläche *1*, daß zwischen beiden ein kleiner Keilwinkel besteht, und erkennt mit einem Mikroskopobjektiv *3* im Bereich dieses Keils eine mehr oder weniger große Anzahl schmaler Interferenzstreifen. Diese sind um so schärfer, je kleiner der Abstand zwischen Objektebene und Vergleichsfläche, je kleiner die Beleuchtungsapertur, je besser die Monochromasie des verwendeten Lichts und je höher das Reflexionsvermögen von Präparatoberfläche und Vergleichs-

fläche sind. Alle Unregelmäßigkeiten auf beiden Flächen werden sehr empfindlich durch Auslenkung der Interferenzstreifen registriert.
Die besondere Schärfe der durch Vielstrahlinterferenzen erzeugten Interferenzstreifen beruht auf dem hohen Reflexionsgrad von Objekt- und Vergleichsfläche, wodurch im Gegensatz zu den Zweistrahlinterferenzen auch die mehrfach reflektierten Strahlen noch eine relativ große Intensität haben und sehr viele Teilstrahlen miteinander interferieren.
Von verschiedenen Herstellern ist eine Zusatzeinrichtung geschaffen worden, mit der das die Vergleichsfläche tragende Glasplättchen so gehalten wird, daß die erforderlichen Justierbewegungen zum Einstellen der Interferenzstreifen auf die gewünschte Richtung und einen zweckmäßigen Streifenabstand mit ausreichender Feinfühligkeit möglich sind.
Im Bild 6.182 wird die als Zusatzeinrichtung für Auflichtmikroskope des VEB Carl Zeiss JENA entwickelte Interferenzanordnung mit Vergleichsplättchen nach *Tolansky* am Universalforschungsmikroskop NU gezeigt.
Sie besteht aus einem Grundkörper, der an den Epikondensor anstelle des Dunkelfeldspiegels angeschraubt wird und derdas federnd und justierbar angeordnete Vergleichsplättchen trägt. Die Höhenverstellung geschieht durch den Rändelring und die Kippung und Zentrierung durch die im

Bild 6.182. Interferenzeinrichtung für Auflichtmikroskope mit Vergleichsplättchen nach Tolansky am Universalforschungsmikroskop NU
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

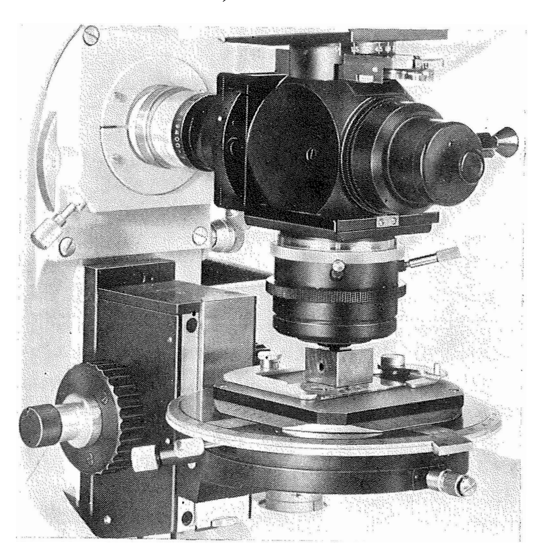


Bild sichtbaren Zentrierschrauben. Außerdem läßt sich das Vergleichsplättchen noch um die optische Achse drehen, so daß die Interferenzstreifen im Abstand geändert und in jede beliebige Richtung gedreht werden können.
Im allgemeinen arbeitet man mit diesem Gerät in niedrigen Interferenzordnungen, weil dann mit einer einfachen Beleuchtungsanordnung kontrastreiche Interferenzstreifen zu erhalten sind, so daß diese Interferenzanordnung mit relativ einfachen Auflichtmikroskopen verwendbar ist. Um die niedrigen Interferenzordnungen in jedem Fall auch wirklich erreichen zu können, werden ebene und erhabene (meist kugelförmige) Vergleichsplättchen für erhabene und ebene Proben verwendet; denn bei ebener Vergleichs- und Probenfläche liegen die Interferenzstreifen niedriger Ordnung am Rande des Vergleichsplättchens, der sich meist außerhalb des Dingfelds befindet. Aus diesem Grund kombiniert man immer eine ebene mit einer gewölbten Fläche. Man wird dann also vorwiegend mit kreisförmigen Interferenzstreifen arbeiten. In diesem Fall ist die Abweichung von der Kreisform ein Maß für den Gangunterschied, der bei fehlerfreier Vergleichskugel durch die Probenoberfläche hervorgerufen wird. Zum Anpassen des Reflexionsvermögens an die Probenoberfläche werden Vergleichsplättchen mit unterschiedlichem Reflexionsvermögen geliefert.
Eine solche Auflichtinterferenzeinrichtung ist in ihrer Anwendung vor allem durch die relativ geringen erreichbaren Vergrößerungen (maximal 250- bis 300fach), durch die beschränkte Meßgenauigkeit und den geringen Arbeitsabstand begrenzt.

6.2.3.3.
Interferenzanordnungen, bei denen der Vergleichsstrahlengang vom Objekt beeinflußt wird

Die im Abschn. 6.1.3.3. für Durchlicht beschriebenen Interferenzanordnungen lassen sich z.T. auch auf die Auflichtmikroskopie übertragen. Das gilt besonders für das Polarisationsinterferometer nach *Smith* [181] und *Nomarski* [162] und die Interphakoeinrichtung nach *Beyer-Schöppe* [136].
Im Bild 6.183 wird das optische Schema der Interferenzanordnung nach *Nomarski* [463] für Auflicht gezeigt. Gegenüber Durchlicht (Bild 6.55) ist hier nur noch ein Wollastonprisma erforderlich, weil dieses zweimal durchsetzt wird und deshalb gleichzeitig die Funktion des Kompensationsprismas übernimmt.
Da das Interferenzprinzip nach *Smith* und *Nomarski* lediglich kleine relative Bildaufspaltungen

liefert, ist es im wesentlichen nur für differentiellen Interferenzkontrast, d.h. nur zur Kontrastierung brauchbar; in Ausnahmefällen können jedoch auch einfache Gangunterschiedsmessungen durchgeführt werden.

Vom VEB Carl Zeiss JENA wird eine solche Interferenzanordnung als Zusatzgerät zu den Auflichtmikroskopen NEOPHOT 2 und VERTIVAL 2 angeboten (Bild 6.184).

Ein sehr vielseitiges und leistungsfähiges Auflichtinterferenzmikroskop ergibt sich durch Anwendung des im Abschn. 6.1.3.3. beschriebenen Interphakoprinzips in der Auflichtmikroskopie. Das Grundprinzip kann vom Durchlicht voll und ganz übernommen werden. Es lassen sich auch im Auflicht sowohl das Shearing-Verfahren mit totaler und differentieller Bildaufspaltung als auch das Interphakoverfahren durchführen. Dabei sind lediglich einige konstruktive Gesichtspunkte zu beachten, die aus den Besonderheiten der Auflichtbeobachtung resultieren.

Vorausgesetzt wird ein für die Pupillenabbildung korrigierter Auflichtträger (Bild 6.185), der die Durchführung der strengen Köhlerschen Beleuchtung garantiert. Dieser Auflichtträger wird auf das Grundstativ der neuen Mikroskopreihe MIKROVAL aufgesetzt und trägt die eigentliche Interphakoeinrichtung.

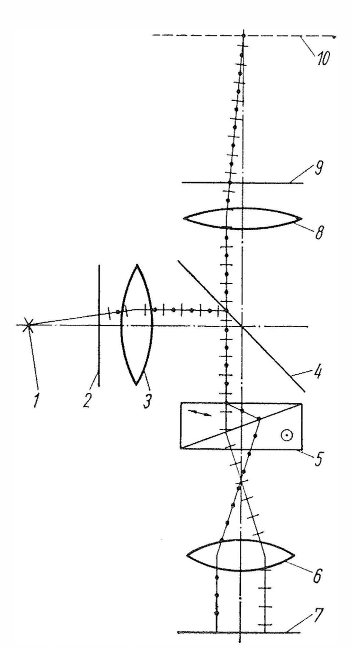


Bild 6.183. Interferenzanordnung nach Nomarski für Auflicht

1 Lichtquelle; *2* Polarisator; *3* Beleuchtungslinse; *4* Planglas; 5 Wollastonprisma; *6* Objektiv; *7* Objektebene; *8* Tubuslinse; *9* Analysator; *10* Zwischenbildebene

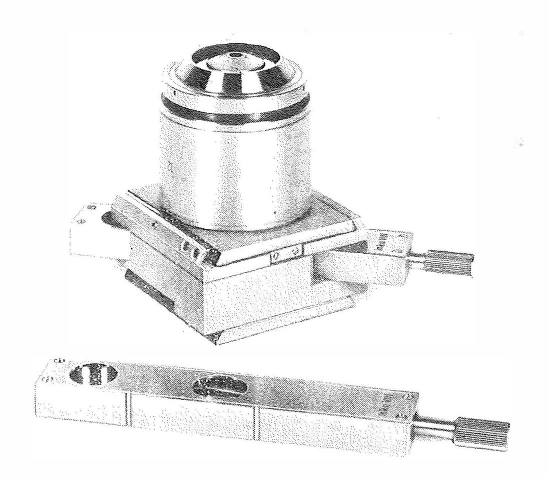


Bild 6.184. Interferenzkontrasteinrichtung nach Nomarski für die Auflichtmikroskope NEOPHOT 2 und VERTIVAL 2

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Der Beleuchtungsstrahlengang soll anhand des Bilds 6.185 erläutert werden.

Die Lichtquelle *1* wird vom Kollektor *2* in die Ebene des Spalts *3* und der Spalt von der Linse *4* ins Unendliche sowie von der Linse *6* nach Reflexion am Teilungsspiegel *7* in die hintere Brennebene *8* des Objektivs *9* abgebildet. Das Objektiv *9* bildet das Spaltbild ins Unendliche und nach Reflexion an der Präparatoberfläche *10* wieder in seine hintere Brennebene *8* ab. Über die Tubuslinse *11*, die Negativlinse *12*, das Schiebeprisma *13*, die Linsengruppen *14* und *16* erfolgt dann, wie im Durchlicht, die Abbildung des Spaltbilds nach *18*. Die Leuchtfeldblende 5 wird von der Linse *6* über den Teilungsspiegel *7* ins Unendliche und vom Objektiv in die Objektebene nach *10* abgebildet. Alles Weitere kann aus der Beschreibung der Durchlichtanordnung entnommen werden.

Auf einen wesentlichen, besonders für die praktische Arbeit bedeutsamen Unterschied zwischen den in den Abschnitten 6.2.3.2. und 6.2.3.3. beschriebenen Interferenzanordnungen sei an dieser Stelle noch hingewiesen. Er bezieht sich auf die Stabilität des Interferenzbilds.

Bei den im Abschn. 6.2.3.2. genannten Anordnungen ist die Vergleichswelle nicht am Objekt reflektiert worden, so daß eine Abstandsänderung zwischen Objektiv und Objekt einen Gangunterschied zwischen Objekt- und Vergleichswelle hervorruft, der der doppelten Abstandsänderung entspricht. Daraus resultiert eine sehr große Empfind-

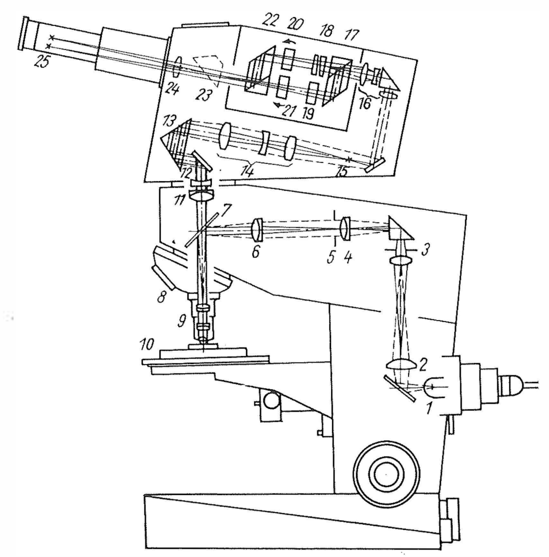


Bild 6.185. Strahlengang des nach dem Interphakoprinzip arbeitenden Interferenzmikroskops EPIVAL interphako
VEB Carl Zeiss JENA
1 Lichtquelle; *2* Kollektor; *3* Beleuchtungsspalt; *4* und *6* Beleuchtungslinsen; *5* Leuchtfeldblende; *7* Teilungsspiegel; *8* Objektivbrennebene; *9* Objektiv; *10* Objektebene; *11* Tubuslinse; *12* Negativlinse; *13* Schiebeprisma; *14* und *16* Zwischenabbildungssystem; *15* 1. Zwischenbild; *17* und *22* Interferometerprismen; *18* 3. Spaltbild, Drehkeil; *19* Ausgleichskeil; *23* Fotoprisma; *24* Bertrand-Linse; *25* Okularbildebene

Wesentlich sind dabei in erster Linie die Rauhtiefe, die nach Bild 6.186 als die größte im Mikrobereich der Oberfläche auftretende Höhendifferenz definiert ist, und die Anzahl und Breite der vorhandenen Bearbeitungsriefen oder Kratzer. Die mit dieser Methode ebenfalls möglichen Formprüfungen standen dabei zunächst im Hintergrund.
Die Messung der Rauhtiefe wurde grundsätzlich und wird auch heute noch nach der Streifenmethode durchgeführt. Die Interferenzstreifen für eine glatte Fläche können dabei, je nach Form von Präparat- und Vergleichsfläche, geradlinig oder gekrümmt sein. Die noch deutlich erkennbare Auslenkung von 1/10 Streifenabstand, der einer Höhendifferenz von etwa 0,03 μm entspricht, wird für diese Untersuchungen als vollkommen

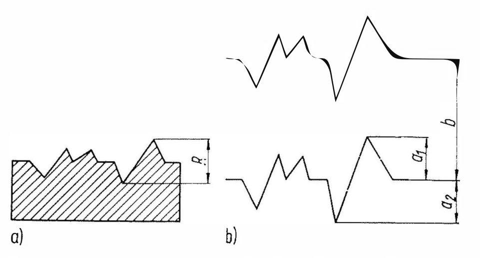


Bild 6.186. Auswertung des Interferenzbildes bei der Untersuchung bearbeiteter Oberflächen
a) Oberflächenprofil;
b) aus a) resultierender Verlauf der Interferenzstreifen

ausreichend angesehen. Die Auswertung des Interferenzbilds erfolgt entweder direkt im Mikroskop oder besser auf der Mikrofotografie durch Ausmessen der Streifenauslenkungen a_1 und a_2 und des Streifenabstands b. Die Mikrofotografie wird deshalb in diesem Fall vorgezogen, weil sie ein Momentbild darstellt, so daß die Messungen dann unabhängig von irgendwelchen Änderungen im Mikroskop sind, z. B. durch theoretische und mechanische Einflüsse hervorgerufene Streifenverschiebungen, und damit gleichzeitig ein Bilddokument vorliegt, auf das man jederzeit zurückgreifen kann. Die Rauhtiefe R ergibt sich aus Bild 6.186 zu

$$R = \frac{a_1 + a_2}{b} \frac{\lambda}{2}$$

oder, mit den aus dem Bildbeispiel zu entnehmenden Zahlenwerten und Verwendung von Natriumlicht (λ = 589 nm), zu

$$R = \frac{6 + 5{,}5}{16} \cdot \frac{0{,}589}{2}\,\mu\text{m} = 0{,}212\,\mu\text{m}.$$

lichkeit gegen Erschütterungen, weil schon eine Schwingungsamplitude von etwa $\lambda/4$ nur noch ein schwaches Interferenzbild erkennen läßt.
Die im Abschn. 6.2.3.3. beschriebenen Anordnungen hingegen sind gegenüber Erschütterungen erheblich unempfindlicher, weil der Vergleichsstrahl ebenfalls am Objekt reflektiert wird und somit für Objekt- und Vergleichswelle die optischen Wege in gleicher Weise geändert werden.

6.2.3.4. Anwendungen

Im modernen Maschinen- und Gerätebau spielt bei stark beanspruchten, rollenden oder gleitenden Teilen, wie Wälzlagern, Achsen, Zylindern oder Präzisionsflächen an Meß- und Prüfgeräten, oft die Oberflächengüte eine entscheidende Rolle. Es geht dabei sowohl um die Güte frisch bearbeiteter, z. B. gedrehter, geschliffener, geläppter Flächen oder um eine Zwischenkontrolle während des Bearbeitungsprozesses als auch um die Frage des Verschleißes, weil davon die Lebensdauer der Maschine oder des Geräts abhängt.

Dabei wurde zunächst vorausgesetzt, daß die Beleuchtungsapertur klein ist und sich die Probenoberfläche in Luft befindet.
Zunächst sei auf einige Arbeiten eingegangen, die sich mit der praktischen Anwendung der Interferenzmikroskopie auf bearbeitete technische Oberflächen befassen.
Nachdem *Linnik* [461] die nach ihm benannte, auf dem Michelson-Prinzip beruhende interferenzmikroskopische Anordnung beschrieben hatte, ist von Carl Zeiss JENA das erste nach diesem Prinzip arbeitende kommerzielle Interferenzmikroskop für Auflichtbeobachtungen entwickelt worden. *Kinder* [456] hat eine erste Beschreibung dieses Geräts und seinen praktischen Einsatz in Form einiger Anwendungsbeispiele gegeben. Die Arbeit zeigt Interferenzaufnahmen der Endmaßflächen, eines angeläppten Stahlzylinders, einer geschliffenen Stahlkugel und der Schneide einer Rasierklinge.
Zwei in stärkerem Maße auf die Anwendung der Interferenzmikroskopie zugeschnittene Arbeiten sind von *Kohaut* [458] [459] veröffentlicht worden, auf die etwas ausführlicher eingegangen werden soll. Die Bilder 6.187 bis 6.194 wurden der erstgenannten, schon 1943 durchgeführten, aber erst 1948 veröffentlichten Arbeit entnommen. Sie wurden alle mit einer Linnik-Anordnung im grünen Quecksilberlicht ($\lambda = 0{,}546\ \mu m$) erhalten.
In den Bildern 6.187 und 6.188 werden die Meßflächen eines neuen, unbenutzten und eines benutzten Endmaßes gezeigt. Während aus den Interferenzstreifen im Bild 6.187 kaum Unregelmäßigkeiten zu erkennen sind, läßt sich aus Bild 6.188 aufgrund der Streifenversetzung bis zu mehr als einem halben Streifenabstand ableiten, daß Riefen bis zu einer Tiefe von mehr als 0,15 μm vorhanden sind. Für großflächige Abweichungen von der Ebenheit ist die Methode weniger geeignet, weil neben der ideal ebenen Vergleichsfläche auch innerhalb der verlangten Meßgenauigkeit einwandfreier Abgleich beider Strahlengänge vorausgesetzt werden muß.
Bei der Interferenzaufnahme einer Kugel mit ebener Vergleichsfläche zeigen sich in den Bildern 6.189 und 6.190 Interferenzringe, deren Abstände vom Durchmesser der Kugel abhängen und die mit der Entfernung vom Mittelpunkt kleiner werden. Im Bild 6.189 sind die Interferenzringe regelmäßig, während im Bild 6.190 durch die in der Kugel vorhandenen Riefen Streifenauslenkungen von mehr als einem Streifenabstand auftreten. Diese Riefen sind entstanden, nachdem die Kugel viele Stunden lang in einem Wälzlager

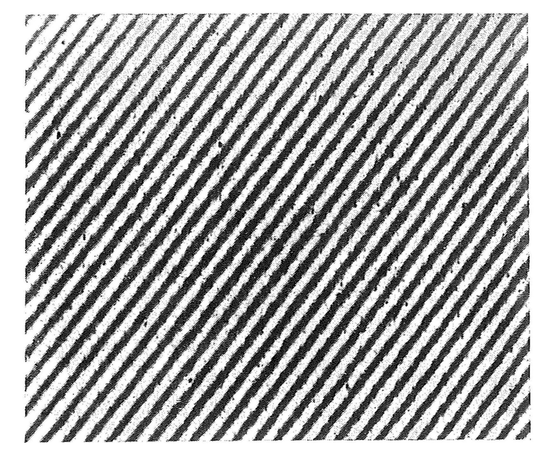


Bild 6.187. Meßfläche eines neuen, unbenutzten Endmaßes
M 180:1 [458]

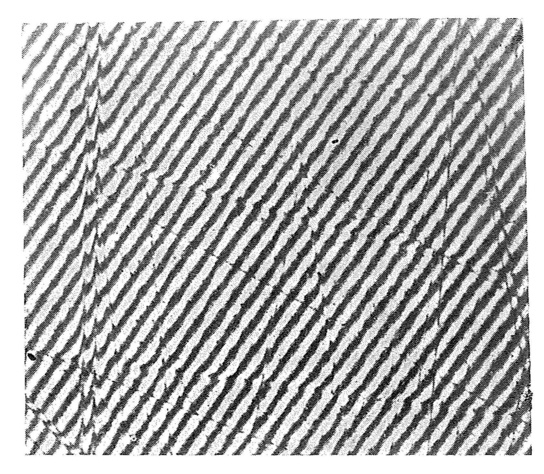


Bild 6.188. Meßfläche eines benutzten Endmaßes
M 180:1 [458]

mit hoher Drehzahl ohne Schmierung gelaufen ist.
Im Bild 6.191 wird die Rollbahn im Außenring eines Genauigkeitswälzlagers mit besonders hoher Güte gezeigt, während die Rollbahn des Innenrings eines Wälzlagers, im Bild 6.192 dargestellt, noch deutliche Bearbeitungsriefen bis zu 0,2 μm Tiefe zeigt.
Für Oberflächenuntersuchungen ist auch vielfach die schon im Abschn. 6.2.2.5. beschriebene Lackabdruckmethode verwendet worden. Sie bringt vor allem Vorteile bei der interferenzmikroskopischen Untersuchung schwer zugänglicher Flächen und zur Erweiterung des Meßbereichs bei gemin-

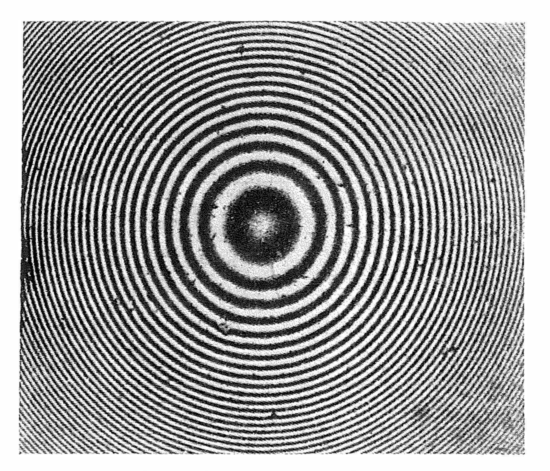


Bild 6.189. Oberfläche einer neuen Stahlkugel mit 4,76 mm Dmr.
M 180:1 [458]

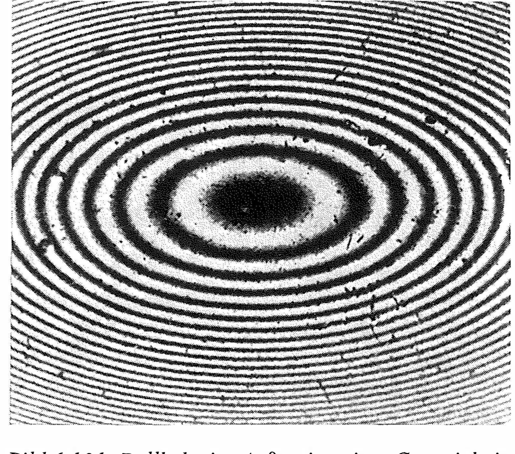


Bild 6.191. Rollbahn im Außenring eines Genauigkeitswälzlagers
M 180:1 [458]

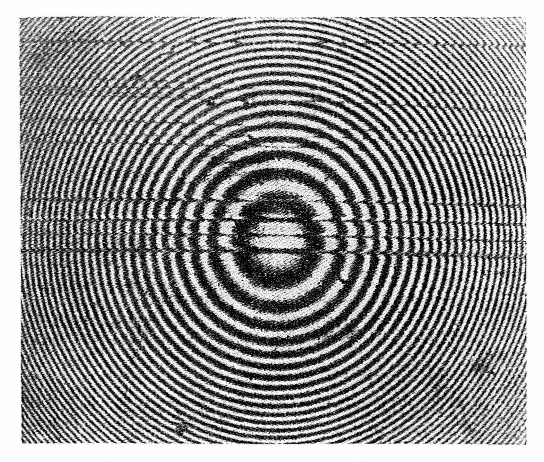


Bild 6.190. Oberfläche einer beschädigten Stahlkugel mit 4,76 mm Dmr.
M 180:1 [458]

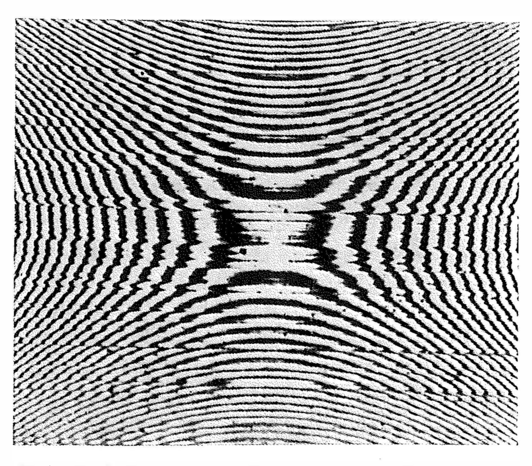


Bild 6.192. Rollbahn im Innenring eines Wälzlagers (einzelne Bearbeitungsriefen sind bis zu 0,2 µm tief)
M 180:1 [458]

derter Meßgenauigkeit. Der Lackabzug kann sowohl im Durch- als auch im Auflicht untersucht werden. Bei der Untersuchung im Durchlicht ist es möglich, durch Angleichung der Brechzahlen von Lackabzug und Einbettungsmittel die auftretenden Gangunterschiede beliebig zu verkleinern und damit den Meßbereich für Höhenunterschiede zu erweitern. Es tritt dabei gleichzeitig eine Filterwirkung ein, d.h., die kleinen Unebenheiten werden zugunsten der gröberen zurückgedrängt. *Zehender* hat dafür eine spezielle Immersionskammer angegeben und das Verfahren erläutert [469].

Durch die von *Tolansky* geschaffenen Grundlagen und die von ihm beschriebenen zahlreichen Anwendungen hat die Methode der Vielstrahlinterferenzen für die Untersuchung gut reflektierender Oberflächen große Verbreitung gefunden [466] [467] [468]. Beispiele für diese Beobachtungsart sind in den Bildern 6.193 und 6.194 dargestellt [459].

Schließlich sei noch die zur Steigerung der Meßgenauigkeit bei der Auswertung von Zweistrahlinterferogrammen entwickelte Äquidensitenmethode erwähnt [460]. Sie läßt sich am einfachsten realisieren, wenn man gleichzeitig ein Positiv

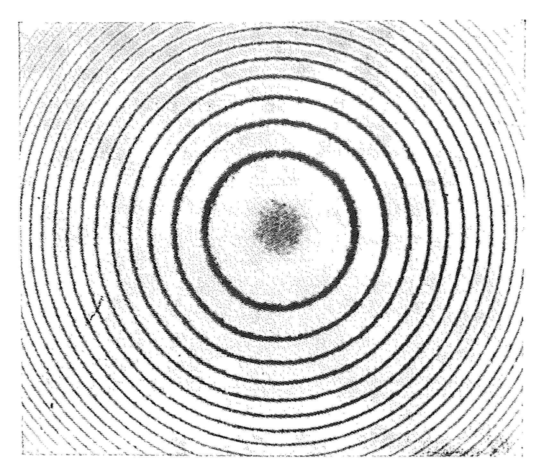


Bild 6.193. Oberfläche einer Stahlkugel, Dmr. 11 mm, im Natriumlicht mit Vielstrahlinterferenzen
M 120:1 [458]

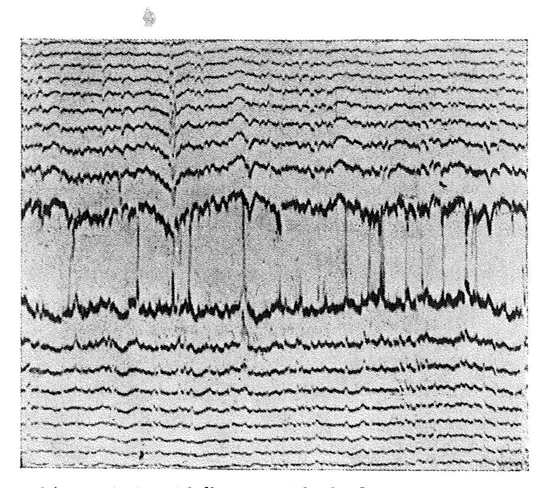
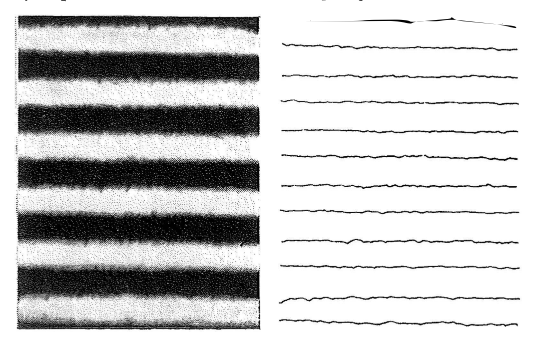


Bild 6.194. Geschliffener Stahlzylinder, Dmr. 6 mm im Natriumlicht mit Vielstrahlinterferenzen
M 140:1 [458]

Bild 6.195. Interferogramme
a) Oberfläche eines Endmaßes im Interferenzmikroskop; b) Äquidensiten zum Bild 6.195a [158]



und ein Negativ optimal abgestimmter Schwärzung aufeinanderlegt und gemeinsam auf eine Fotoschicht kopiert. Es werden hierdurch von den Interferogrammen (Bild 6.195 a) Äquidensiten, d.h. Kurven gleicher Schwärzung erhalten (Bild 6.1 95 b). Aus jedem relativ breiten Interferenzstreifenentstehen zwei sehr schmale Äquidensiten, die mehr Einzelheiten erkennen und sich genauer vermessen lassen, als es bei den Interferenzstreifen der Fall ist.

Mit der Entwicklung der Shearinginterferometer und ihrer Anwendung in Verbindung mit dem Mikroskop ist eine neue Kontrastmethode, der differentielle Interferenzkontrast, eingeführt worden, der immer größere Verbreitung findet. Es wird entsprechend Bild 6.196 ein Reliefkontrast erzeugt, der in der Lage ist, auch feinste Objektstrukturen kontrastreich darzustellen. Er tritt damit in ernsthafte Konkurrenz zum Auflichtphasenkontrast.

Die Vorteile gegenüber Phasenkontrast liegen vor allem darin, daß keine diffizile Probenvorbereitung erforderlich ist. Es können neben den üblichen Metall- oder Erzanschliffen auch weniger gut bearbeitete, unebene Oberflächen, z.B. von Gebrauchsporzellan und auch anderem Material, untersucht werden, wenn sie nur genügend gut reflektieren. Der Nachteil besteht vor allem in der Unsymmetrie des Bilds, wodurch die allgemeine Bildqualität beeinträchtigt wird und die parallel zur Aufspaltungsrichtung verlaufenden Phasenstrukturen nicht erfaßt werden.

Genaue Gangunterschiedsmessungen an Metallschliffen zum Bestimmen von Höhenunterschieden der verschiedenen Gefügebestandteile sind

Bild 6.196. Hüttenkobalt, elektrolytisch poliert und geätzt, im Interferenzkontrast mit differentieller Bildaufspaltung
M 400:1



bisher recht selten durchgeführt worden (s. Abschnitt 6.2.2.4.).

Erst mit der technischen Entwicklung dünner Schichten, besonders der Halbleitertechnik und Mikroelektronik, sind der Interferenzmikroskopie neue, höhere Forderungen gestellt worden, die die Entwicklung hochleistungsfähiger Interferenzmikroskope erforderlich machten. Die Forderungen beziehen sich sowohl auf die Steigerung des Auflösungsvermögens als auch auf die Erhöhung der Meßgenauigkeit, die nur bei Verwendung von Interferenzmikroskopen höchster Leistung miteinander in Einklang zu bringen sind.

Es sollen nun einige mit dem Interphakomikroskop für Auflicht an praktischen Beispielen aus der Dünnschichttechnik durchgeführte Messungen beschrieben werden, die einige Aussagen über die Möglichkeiten und Grenzen der Auflichtinterferenzmikroskopie zu machen gestatten.

Während bei der Untersuchung feinbearbeiteter Oberflächen am zweckmäßigsten die Interferenzstreifenmethode angewendet wird, weil sie sofort einen Überblick über die Abweichungen von der geforderten Oberflächengestalt (z.B. Ebene, Kugel, Zylinder) gibt, ist diese Methode bei sehr kleinen, auch in der Längsrichtung begrenzten Abweichungen von der Sollfläche nicht gut geeignet. Statt dessen wird in diesem Fall eines der schon im Abschn. 6.1.3.2. für Durchlicht beschriebenen Meßverfahren im homogenen Feld angewendet.

Als Meßobjekt liege eine Vertiefung oder Erhöhung in Form eines Längsstreifens auf einer gut reflektierenden Metalloberfläche, wie im Bild 6.197 dargestellt, vor, deren Höhe bestimmt

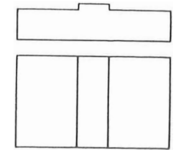


Bild 6.197. Metalloberfläche mit Phasenstreifen als Meßobjekt

werden soll. Dieser Streifen und seine Umgebung sollen aus gleichem Werkstoff, z.B. aus Chrom, bestehen. Die vom Interferenzmikroskop erzeugte Vergleichswelle interferiert in der Bildebene mit der Objektwelle und liefert zunächst eine kontrastreiche Darstellung der als Phasenstufe wirkenden Erhöhung oder Vertiefung. Ist die Größen-

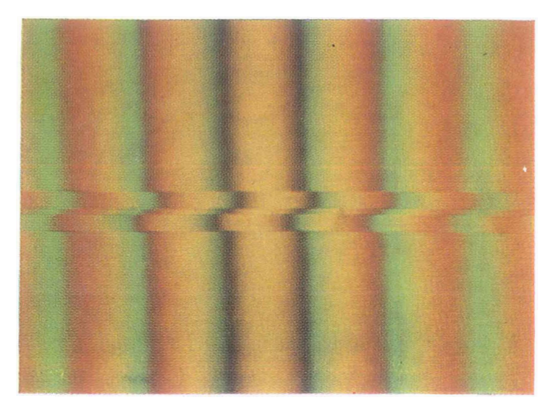
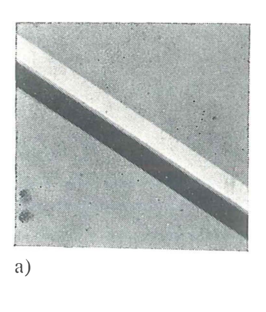
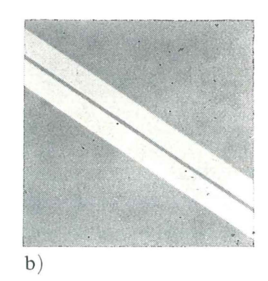


Bild 6.198. Erzeugung eines farbigen Interferenzstreifensystems, das durch den Phasenstreifen ausgelenkt wird

ordnung der Stufenhöhe nicht bekannt, so erzeugt man zunächst, bei Beleuchtung mit weißem Licht, durch Betätigen der dafür vorgesehenen Bedienungselemente ein farbiges Interferenzstreifensystem (Bild 6.198) und ermittelt die zugeordneten Interferenzstreifen, d.h. die, die im Bereich der Stufe und der Umgebung die gleiche Farbfolge zeigen, bzw. den in beiden Bereichen farblosen Streifen. Im Bildbeispiel werden diese zugeordneten Interferenzstreifen durch die Phasenstufe um etwa 1/2 Streifenabstand ausgelenkt. Daraus ergibt sich nach Gl. (6.46 a) eine Stufenhöhe von etwa $\lambda/4 = 550/4$ nm $= 138$ nm. Damit ist die Größenordnung festgelegt. Übersteigt die Stufenhöhe eine halbe Wellenlänge, dann sind zu ihrer Bestimmung die Anzahl der ganzen Streifenabstände, um die die Interferenzstreifen ausgelenkt sind, abzuzählen, und der verbleibende Rest als Bruchteil eines Streifenabstands abzuschätzen. Es wird dann im monochromatischen Licht nur noch dieser Bruchteil gemessen. Bei sehr kleinen Objekten wird bei homogenem Sehfeld die Interferenzordnung durch die Farbfolge bestimmt, die beim Betätigen des Kompensators nacheinander erscheint. Häufig ist in der Praxis die ungefähre Dicke bekannt, so daß nur Bruchteile eines Streifenabstands zu vermessen sind. Nachdem die Interferenzordnung bestimmt worden ist, kann die genaue Messung im monochromatischen Licht (s. Abschn. 6.1.3.2.) erfolgen. In den Bildern 6.199 a und b wurden zunächst Objekt und Umgebung nacheinander auf größte Dunkelheit gestellt und die jeweiligen Einstellwerte a und b auf der Meßtrommel abgelesen. Diese Messung wurde 5mal an der gleichen Objektstelle


a)


b)

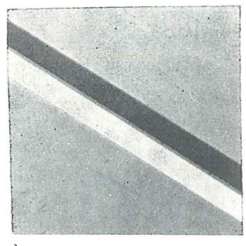
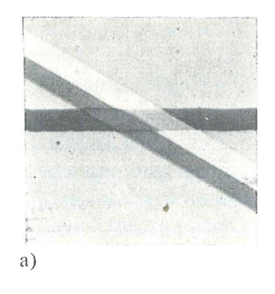
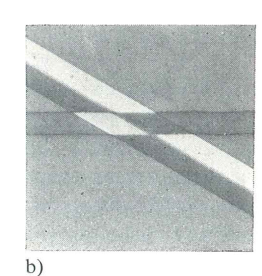

c)

Bild 6.199
Zur Durchführung einer Höhenmessung nach dem Shearingverfahren


a)


b)

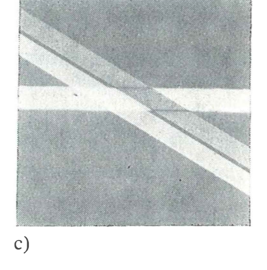

c)

Bild 6.200
Höhenmessung wie im Bild 6.199, jedoch unter Verwendung der Halbschattenplatte

durchgeführt und zur Erhöhung der Meßgenauigkeit das arithmetische Mittel von der Differenz der Einzelmessungen gebildet.

a	70,8	71,5	71,2	71,5	72,0
b	42,0	41,5	42,1	42,7	42,2
$a - b$	28,8	30,0	29,1	28,8	29,8

Mittel = 29,3.

Der Eichwert für das Trommelintervall wurde, auf den Gangunterschied bezogen, zu 5,14 nm bestimmt.
Also ergibt sich für die Stufenhöhe

$$d = 29{,}3 \cdot 5{,}14/2 = 75{,}3 \begin{matrix} +\ 1{,}8 \\ -\ 1{,}3 \end{matrix} \text{ nm.}$$

Bei Messung vom unverschobenen zum verschobenen Bild nach Einstellung a und c erhält man

a	72,0	72,2	72,0	72,5	72,3
c	12,5	12,0	12,8	13,8	13,5
$a - c$	59,5	60,2	59,2	58,7	58,8

Mittel = 59,5,

$$d = 59{,}5 \cdot 5{,}14/4 = 76{,}5 \pm 0{,}9 \text{ nm.}$$

Bequemer und noch zuverlässiger ist das Messen unter Verwendung der Halbschattenplatte. Das Meßprinzip ist schon im Abschn. 6.1.3.3. anhand des Bilds 6.59 erläutert worden. Der im Bild 6.200 sichtbare waagerechte Streifen stellt den durch das Interferometer verschobenen Bereich des Vergleichsbilds der Halbschattenplatte dar, in dem auch gemessen wird. Es kann auch hier von einem Bild zur Umgebung nach a, b oder von einem zum anderen Bild nach a, c gemessen werden; d. h., in a muß der waagerechte Streifen das eine Objektbild ohne Helligkeitsänderung durchsetzen, in b ist die Helligkeit des waagerechten Streifens mit der Umgebung, also dem objektfreien Bereich, abgeglichen, während in c das Vergleichsbild des Objekts ohne Helligkeitsänderung durchsetzt wird.
Die so erhaltenen Meßwerte waren im ersten Fall

a	82,0	81,7	82,5	82,7	83,0
b	52,2	52,0	52,5	53,3	53,5
$a - b$	29,8	29,7	30,0	29,4	29,5

Mittel = 29,7,

$$d = 29{,}7 \cdot 5{,}14/2 = 76{,}3 \pm 0{,}8 \text{ nm}$$

und im zweiten Fall

a	83,0	83,5	83,5	83,3	84,0
c	23,7	23,5	23,8	23,6	23,8
$a - c$	59,3	60,0	59,7	59,7	60,2

Mittel = 59,8,

$$d = 59{,}8 \cdot 5{,}14/4 = 76{,}8 \pm \begin{matrix} 0{,}5 \\ 0{,}6 \end{matrix} \text{ nm.}$$

Man kann aus diesem praktischen Meßbeispiel ersehen, daß die Meßunsicherheit bei Verwendung der Halbschattenplatte verringert wird.

Die Chromstufe auf einer Chromunterlage stellt ein nahezu ideales Meßobjekt dar, weil Objekt- und Vergleichswelle überall die gleiche Amplitude haben und deshalb die Helligkeit durch Interferenz theoretisch bis auf Null herabgedrückt werden kann. Daraus resultieren ein besonders guter Interferenzkontrast und eine relativ große Einstellsicherheit bei der Messung. Bei einem Chromstreifen auf Glas ist das wegen des stark differierenden Reflexionsvermögens (Chrom etwa 70, Glas etwa 5 %) weniger günstig. Die zugehörigen relativen Amplituden sind $\sqrt{0,7} = 0,835$ und $\sqrt{0,05} = 0,224$, so daß die aus der Interferenz resultierenden minimalen und maximalen Amplituden $0,835 - 0,224 = 0,611$ und $0,835 + 0,224 = 1,059$ und die entsprechenden Intensitäten 0,374 und 1,12 sind. Bei Chrom auf Chrom sind diese Intensitäten 0 und 2,79. Doch auch bei Chrom auf Glas lassen sich noch sehr gut Interferenzmessungen mit nur wenig geminderter Genauigkeit durchführen. Allerdings muß bei genauen Messungen noch der Phasensprung bei der Reflexion des Lichts berücksichtigt werden, der in die Messung mit eingeht (Bild 6.164).

Der Meßfehler würde für das genannte Beispiel bei Nichtbeachtung des Phasensprungs im grünen Licht etwa 12 nm betragen.

Ein weiterer Meßfehler tritt auf, wenn zu große Beleuchtungsaperturen verwendet werden, da sich der Gangunterschied mit dem Kosinus des Einfallswinkels α ändert. Wird der Gangunterschied für senkrechten Lichteinfall mit Δ_0 bezeichnet, dann ist er für den Einfallswinkel α

$$\Delta_\alpha = \Delta_0 \cos \alpha .$$

Er wird also, im Gegensatz zum Durchlicht, zu klein gemessen. Zur Eliminierung dieses Fehlers läßt sich durch Vergleich der Messung mit großer und der mit genügend kleiner Beleuchtungsapertur der Korrekturfaktor ermitteln.

Besonders wichtig für die Halbleitertechnik, aber auch für alle anderen Arbeitsgebiete anwendbar, ist die schon im Abschn. 6.1.3.4. beschriebene Methode der genauen Messung sehr kleiner, in der Objektebene gelegener Strecken, z.B. Breite und Abstand kleiner Halbleiterelemente. Vorteilhaft und mit hoher Genauigkeit sind diese Messungen durchzuführen, wenn ein Interferenzmikroskop mit kontinuierlicher Bildaufspaltung, wie das Interphakomikroskop, zur Verfügung steht. Das Meßprinzip beruht auf der Tatsache, daß bei homogenem Bildfeld (ohne Interferenzstreifen) und Einstellung einer lateralen Bildaufspaltung in der Austrittspupille des Mikroskops Interferenzstreifen erscheinen, deren Abstand der Größe der Bildaufspaltung umgekehrt proportional ist.

Es sei anhand der Darstellung im Bild 6.201 erläutert.

In a) ist das kleine Halbleiterelement dargestellt, dessen Breite a gemessen werden soll. Zu diesem Zweck spaltet man das Bild auf, bis sich die beiden Teilbilder in b) gerade berühren. Dann stimmt die Aufspaltungsgröße mit der Breite a überein. Sie berechnet sich nach der Beziehung

$$a = \frac{k}{dM} \frac{\lambda}{\lambda_0}.$$

Die Gerätekonstante für die Wellenlänge λ_0 ist k und M der Abbildungsmaßstab des verwendeten Objektivs.

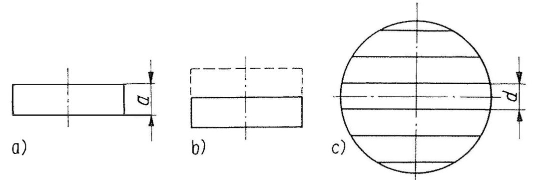


Bild 6.201. Zur Messung kleiner, in der Objektebene gelegener Strecken

Beim Interphakomikroskop werden die Interferenzstreifen nach Bild 6.201 c mit der Bertrand-Linse in die Zwischenbildebene abgebildet und dort ihr Abstand, entweder mit einer Okularmeßplatte oder einem angesetzten Meßschraubenokular, gemessen. Für die Wellenlänge $\lambda_0 = 546$ nm ist die Konstante zu etwa 120 bestimmt worden, so daß man

$$a = \frac{120}{dM} \frac{\lambda}{546} \text{ µm} \quad \text{erhält,}$$

wobei d in mm und λ in nm einzusetzen ist.

Es sei hierzu ein Meßbeispiel angeführt. Bei Verwendung eines Interferenzfilters ($\lambda = 574$ nm) und eines 63fachen Objektivs wurde ein Interferenzstreifenabstand von $d = 1,23$ mm gemessen. Dann ergibt sich die Breite des Elements zu

$$a = \frac{120}{1,23 \cdot 63} \cdot \frac{574}{546} = 1,63 \text{ µm}.$$

So sind noch Abstände mit hoher Genauigkeit zu messen, die unterhalb der Auflösungsgrenze des Objektivs liegen.

6.2.4. Auflichtpolarisationsmikroskopie

von Ing. *Joachim Bergner*

6.2.4.1. Optische Grundlagen

Reflexion linear polarisierten Lichts an isotropen durchsichtigen Medien

Die Reflexion eines linear polarisierten Lichtstrahls an einem isotropen durchsichtigen Objekt ist vom Einfallswinkel, vom Winkel zwischen Einfallsebene *EE* und Schwingungsebene *SE* sowie von der Brechzahl des reflektierenden Materials abhängig. Das Azimut der reflektierten Schwingung stimmt nur bei senkrechtem Lichteinfall (und beliebigem Winkel zwischen *EE* und *SE*) oder bei einem Winkel von 0° bzw. 90° zwischen *EE* und *SE* (bei beliebigem Einfallswinkel) mit dem der einfallenden Schwingung überein; im allgemeinen Fall tritt eine Drehung der durch den Polarisator festgelegten Schwingungsebene ein.

Im Auflichtpolarisationsmikroskop herrscht senkrechter oder nahezu senkrechter Lichteinfall vor. Wird hinter das Objekt ein zweiter Polar, der Analysator, so eingeschaltet, daß die Schwingungsrichtung des von ihm durchgelassenen Lichts (kurz: Schwingungsrichtung des Analysators) senkrecht zu der des vom Polarisator kommenden Lichts (Schwingungsrichtung des Polarisators) liegt, so erscheint ein isotropes durchsichtiges, nicht streuendes Objekt zwischen diesen gekreuzten Polaren in jeder beliebigen azimutalen Lage dunkel, vorausgesetzt, der Polarisationszustand des Lichts wird nicht durch zwischengeschaltete optische Elemente gestört (s. Abschn. 6.2.4.2.).

Das vom Objekt bei senkrechtem Lichteinfall reflektierte Licht ist in seiner Intensität nur von der Differenz der Brechzahlen an der reflektierenden Grenzfläche und deren Dispersionen abhängig (s. Abschn. 6.2.5.1.).

Reflexion linear polarisierten Lichts an anisotropen durchsichtigen Medien

Bei der Reflexion linear polarisierten Lichts an anisotropen durchsichtigen Medien tritt zusätzlich zu den genannten Einflußgrößen noch die Abhängigkeit von der kristallografischen Orientierung der reflektierenden Fläche auf. In Schnitten senkrecht zur optischen Achse verhält sich das reflektierende Medium wie ein isotropes. In allen anderen Schnitten variiert das Reflexionsvermögen zwischen Extremwerten in Abhängigkeit vom Azimut des Objekts. Diese Extremwerte (uniradiale Reflexionen R_1 und R_2) treten in den Hauptschwingungsrichtungen (s. Abschn. 6.1.4.) auf. Minerale mit deutlicher Doppelbrechung (z.B. Karbonate) zeigen daher auch eine deutliche Änderung des Reflexionsvermögens beim Drehen mit dem Objekttisch gegen die Schwingungsrichtung des Polarisators.

Zwischen gekreuzten Polaren erscheinen Schnitte senkrecht zur optischen Achse in jedem Azimut dunkel. Alle anderen Schnitte variieren ihre Intensität zwischen Null und einem Maximum. Die Auslöschungslagen ($J_+ = 0$) treten nach jeweils 90° Drehung auf; das Maximum liegt von diesen 45° entfernt. In diesen 45°- oder Diagonallagen ist die resultierende Komponente des reflektierten Lichts eine lineare Schwingung, deren Azimut A_R gegen die Schwingungsebene der einfallenden Welle für Schnitte parallel zur optischen Achse eines zweiachsigen Materials als Diagnostikum verwendet werden kann [474] (s. Abschnitt 6.2.4.3.).

Reflexion linear polarisierten Lichts an isotropen absorbierenden Medien

Durchläuft Licht der Intensität I_0 ein absorbierendes Medium der Dicke d, so wird die Intensität reduziert auf

$$I = I_0 e^{-4\pi k d/\lambda}. \qquad (6.47)$$

Der Absorptionskoeffizient des Mediums ist k ($k = n\varkappa$; $\varkappa$ = Absorptionsindex). Eine strenge Abgrenzung von durchsichtigen und absorbierenden Medien nach dem k-Wert wurde bisher nicht durchgeführt. Objekte mit $k > 0{,}01$ sind in Dünnschliffdicke undurchsichtig und müssen im polierten Anschliff untersucht werden. Bezüglich der Reflexion senkrecht einfallenden, linear polarisierten Lichts verhalten sich isotrope absorbierende Medien wie isotrope transparente. Das von n und k abhängige Reflexionsvermögen (s. Abschnitt 6.2.5.1.) ist azimutunabhängig. Zwischen gekreuzten Polaren erscheinen isotrope absorbierende Medien in jedem Azimut dunkel.

Reflexion linear polarisierten Lichts an anisotropen absorbierenden Medien

Anisotrope absorbierende Medien sind dadurch gekennzeichnet, daß sowohl die Brechzahl als auch der Absorptionskoeffizient richtungsabhängig sind. Beide Werte variieren zwischen zwei Extremwerten, die parallel den Hauptschwingungsrichtungen im Kristall auftreten und

mit abnehmender Kristallsymmetrie in immer geringerem Maße mit den kristallografischen Richtungen verbunden sind. Entsprechend der Anisotropie erleidet ein einfallender Lichtstrahl eine Doppelbrechung. Die in den Kristall eintretenden beiden Komponenten parallel den Hauptschwingungsrichtungen sind meist elliptisch polarisiert. Bei tetragonalen, trigonalen und hexagonalen Kristallen sind diese Strahlen linear polarisiert, zirkular dagegen für Flächen senkrecht zu einer der vier Windungsachsen niedersymmetrischer Kristalle, die hierdurch gekennzeichnet sind. Die in den Hauptschwingungsrichtungen reflektierten Teilkomponenten weisen nicht nur ungleiches Reflexionsvermögen, sondern auch eine Phasendifferenz auf.
Sie überlagern sich also in den von 0°, 90° usw. abweichenden Polarisationsazimuten zu einer elliptischen Schwingung mit einer Elliptizität ϑ(tan $\vartheta = b/a$, wenn b die kleine, a die große Halbachse der Schwingungsellipse darstellen) und einem Hauptachsenazimut ψ zur einfallenden, linear polarisierten Welle. Werden mit ϑ_E und ψ_E die gleichen Parameter der in das Medium eindringenden Wellen bezeichnet, so läßt sich die bei gekreuzten Polaren auftretende reflektierte Intensität beschreiben durch

$$\frac{I_+}{I_E} = (\sin^2 2\psi_E + \tan^2 2\vartheta_E)\, A_+ . \tag{6.48}$$

A_+ ist der maximale Helligkeitsunterschied beim Drehen des Anschliffs unter gekreuzten Polaren und wird nach *Berek* als anisotrope Aufhellung bezeichnet [471]. Man sieht aus Gl. (6.48), daß bei niedersymmetrischen Kristallen wegen $\vartheta_E \neq 0$ selbst in den Normallagen $\psi_E = 0°, 90° \ldots$ keine vollkommene Auslöschung auftritt. Die anisotrope Aufhellung hängt mit den erwähnten Parametern wie folgt zusammen:

$$A_+ = n_0^2 \frac{(n_1 - n_2)^2 + (k_1 - k_2)^2}{[(n_0 + n_1)^2 + k_1^2]\,[(n_0 + n_2)^2 + k_2^2]}$$
$$= \tfrac{1}{2}(1 - \cos 2\psi \cos 2\vartheta)\, \bar{R}.$$

Die Brechzahl des Immersionsmediums ist n_0; n_ν, k_ν sind die Brechzahlen bzw. Absorptionskoeffizienten des Mediums und $\bar{R}$ das mittlere Reflexionsvermögen. Die Aufhellung ist unabhängig von der Wellenlänge des Lichts, also keine Interferenzerscheinung. Da sie weitgehend von der Dispersion der n- und k-Werte abhängig ist, kommt ihrer Messung eine große diagnostische Bedeutung vor allem in der Erzmikroskopie zu. A_+ kann sowohl aus der Messung von n_ν und k_ν nach der Drudeschen Methode als auch aus der Analyse der reflektierten Schwingungsellipse (s. Abschn. 6.2.4.3.) bestimmt werden. Aus den Meßwerten ϑ und ψ können umgekehrt n und k des untersuchten Materials berechnet werden, wenn die Messungen von ϑ, ψ und $\bar{R}$ bei Verwendung zweier verschiedener Einbettungsmedien mit den Brechzahlen n_0 und n'_0 durchgeführt werden. Es ist

$$\frac{R_2}{R_1} = \frac{1 - \sin 2\psi \cos 2\vartheta}{1 + \sin 2\psi \cos 2\vartheta}$$

das Verhältnis der uniradialen Reflexionen. Daraus ergibt sich mit dem Fotometerwert $\bar{R}$

$$R_1 = \frac{2\bar{R}}{1 + (R_2/R_1)}; \quad R_2 = \frac{2\bar{R}}{1 + (R_2/R_1)} \frac{R_2}{R_1}.$$

Schließlich wird

$$n_\nu = \frac{n_0'^2 - n_0^2}{2\left(n_0' \dfrac{1 + R_\nu'}{1 - R_\nu'} - n_0 \dfrac{1 + R_\nu}{1 - R_\nu}\right)};$$

$$k_\nu = \sqrt{\frac{(n_\nu + n_0')^2 R_\nu' - (n_\nu - n_0')^2}{1 - R_\nu'}}.$$

Magnetooptische Erscheinungen

Bei ferromagnetischen Materialien kann nach dem Entmagnetisieren das Vorhandensein eines magnetischen Felds mit makroskopischen Methoden (Kompaßnadel, Eisenfeilspäne) nicht mehr nachgewiesen werden. Wird die Probe jedoch mikroskopisch untersucht, so stellt man fest, daß sie aus kleinen Regionen besteht, von denen jede bis zur Sättigung in einer bestimmten Richtung magnetisiert ist. Diese Regionen bezeichnet man als magnetische Domänen. Sie sind von der Materialstruktur weitgehend abhängig, ändern sich damit auch beim Vorhandensein von Einschlüssen oder Oberflächenfehlern. Unter dem Einfluß eines angelegten Magnetfelds variieren die Domänen mit der Feldstärke und dessen Richtung. Es ist daher von Interesse, sie sowohl im Stand- als auch im Laufbild wiederzugeben.
Bitter benutzte zur Darstellung der magnetischen Domänen eine kolloidale Magnetitsuspension, von der ein Tropfen unter einem Deckglas auf das Objekt gegeben wurde. Die Magnetitteilchen werden durch den Kraftfluß an den Domänengrenzen angezogen. Diese können dann mit einem Metallmikroskop im Dunkelfeld optimal wiedergegeben werden. Die Nachteile dieser Methode bestehen in der Trägheit der Teilchenorientierung, der Abhängigkeit vom Feldgradienten an der Do-

mänengrenze und in dem Mangel, solche feinen Strukturen wiederzugeben, wie sie das Mikroskop auflösen könnte.
Diese Nachteile können durch Anwendung des von *Kerr* entdeckten und nach ihm benannten magnetooptischen Kerreffekts vermieden werden. Nach seiner Beobachtung erfährt eine polarisierte Lichtwelle bei der Reflexion an einer magnetischen Probe eine Änderung ihres Polarisationszustands. Durch das Wirken der Lorentz-Kraft erhält die reflektierte Amplitude eine normal auf ihr stehende phasenverzögerte Komponente, die Kerr-Komponente. Beide überlagern sich zu einer elliptischen Schwingung, die von einem nachfolgenden Analysator nicht ausgelöscht werden kann.
Die Kerr-Wirkung ist von der geometrischen Relation zwischen Lichteinfallsrichtung, reflektierender Oberfläche und Magnetisierungsrichtung abhängig. Danach unterscheidet man drei Fälle [487]:

1. polarer Kerreffekt
   Die Magnetisierungsrichtungen verlaufen senkrecht zur Probenoberfläche.
2. meridionaler (longitudinaler) Kerreffekt
   Die Magnetisierungsrichtungen verlaufen parallel zur Oberfläche und zur Lichteinfallsebene.
3. äquatorialer (transversaler) Kerreffekt
   Die Magnetisierungsrichtungen verlaufen parallel zur Oberfläche und senkrecht zur Lichteinfallsebene.

Beim transversalen Kerreffekt tritt eine Kerr-Komponente nur dann auf, wenn die Polarisationsebene des einfallenden Lichts zur Einfallsebene geneigt ist; sie erreicht ein Maximum bei einem Winkel von 45° zwischen beiden.
Das Verhältnis der Amplitude des normalreflektierten Lichts zur Kerr-Amplitude liegt in der Größenordnung von 1000 : 1, so daß das Hauptachsenazimut der reflektierten Schwingung sehr gering ist und nur Werte in der Größenordnung von Winkelminuten annimmt. Sein Vorzeichen ist von der Magnetisierungsrichtung abhängig; seine Größe wird u.a. vom Material und vom Lichteinfallswinkel bestimmt. Die Hauptachsenazimute sind beim polaren Effekt größer als beim meridionalen und erreichen bei beiden ihr Maximum bei größeren Lichteinfallswinkeln. Während beim meridionalen Effekt bei senkrechtem Lichteinfall keine elliptische Polarisation auftreten kann, kann sie unter gleichen Bedingungen beim polaren Effekt bereits relativ große Werte annehmen.

Magnetooptische Untersuchungen spielen bei der Lösung metallkundlicher Aufgaben eine große Rolle und können darüber hinaus auch bei der Diagnostizierung natürlicher Objekte wertvolle Dienste leisten [484].

6.2.4.2. Auflichtpolarisationsmikroskop

Beleuchtungseinrichtung

Die Darstellung reiner unverfälschter Anisotropieeffekte mit dem Auflichtpolarisationsmikroskop verlangt, daß das auf das anisotrope Objekt fallende Licht vollkommen linear und in allen Teilen des Dingfelds nach der gleichen Ebene polarisiert ist (homogenes Polarisationsfeld). Um diese Bedingung zu erfüllen, werden an die Beleuchtungseinrichtung sehr hohe Anforderungen gestellt. Abweichungen von der Linearität der Polarisation treten dann auf, wenn das Licht unter einem von 90° abweichenden Winkel auf das Objekt auftrifft und wenn es bei seiner Umlenkung am Auflichtilluminator einen Phasensprung erfährt, der von 0 oder 180° abweicht. Die erste Fehlerquelle – Abweichung vom senkrechten Lichteinfall – ist beim Mikroskop grundsätzlich nicht vermeidbar, würde sie doch eine achsenparallele Beleuchtung mit einer numerischen Apertur von 0 verlangen. Da man stets mit endlicher Beleuchtungsapertur arbeiten muß und damit Beleuchtungsstrahlen mit einem von 90° abweichenden Einfallswinkel auftreten, muß dafür gesorgt werden, daß die aufgrund des schrägen Lichteinfalls auftretende Elliptizität des Lichts unter einem Achsenverhältnis von 1 : 100 bleibt, so daß die hierdurch bedingten Modifikationen des Anisotropieeffekts unter der Wahrnehmbarkeitsgrenze bleiben. Dies ist dann der Fall, wenn die Beleuchtungsapertur den Wert von 0,10 bis 0,15 nicht überschreitet. Ein ausreichend homogenes Polarisationsfeld mit azimutalen Fehlern < 0,5° wird erzielt, wenn dieser genannte Wert für alle Teile des Felds eingehalten wird. Dies ist durch eine telezentrische Führung der Beleuchtungsstrahlen im Dingraum zu erreichen. Schließlich muß verlangt werden, daß der Schwerstrahl des beleuchtenden Bündels keine größere Neigung als etwa 8° zur optischen Achse des Mikroskops aufweist. Das Umlenksystem (Illuminator) in der Auflichteinrichtung hat einen großen Einfluß auf Elliptizität und Homogenität des reflektierten Strahlenbündels. Halbdurchlässige Planngläser, wie sie in der Auflicht-Hellfeldmikroskopie verwendet werden, können selbst für diffizile quali-

tative polarisationsoptische Untersuchungen nicht herangezogen werden, weil sie je nach Beschichtung eine Elliptizität des Lichts und zusätzlich eine merkliche Inhomogenität des Felds bewirken. Diese Plangläser können nur in Verbindung mit einer einfachen Polarisationseinrichtung zum Nachweis einer etwa vorhandenen Anisotropie im Objekt verwendet werden.
Der am weitesten verbreitete Illuminator für Auflichtpolarisationsmikroskope geht auf *Berek* zurück und wird als Berek- oder Kompensationsprisma bezeichnet. In diesem trapezförmigen Prisma aus hochbrechendem Glas mit $n = \sqrt{3}$ wird das umzulenkende Licht 3mal reflektiert. Aufgrund dieser beiden Kennzeichen bleibt die Elliptizität der reflektierten Strahlung selbst für stärker geöffnete Bündel (halber Öffnungswinkel etwa 5°) unter 1 : 100; die azimutalen Fehler im Feld bleiben kleiner als 0,04° [470].
Zur Vermeidung der geometrischen Abschattung des Abbildungsstrahlengangs wurde von der Firma Vickers Instrument Ltd., York, eine Auflichtpolarisationseinrichtung ohne Umlenkprisma herausgebracht. Hierbei wurde ein teildurchlässiges Planglas mit einem totalreflektierenden Spiegel so kombiniert, daß Elliptizitäts- und Azimutalfehler in vertretbaren Grenzen bleiben. Bereits vorher hatte *Foster* ein aus Kalkspat bestehendes Umlenkelement beschrieben, das gleichzeitig als Polarisator und Analysator dient, nicht geometrisch abschattet und keine besonderen Vorkehrungen für die Umlenkung des Lichts erfordert [481]. Die genannten Anforderungen an die Führung der Beleuchtungsstrahlen lassen sich am bequemsten und sichersten mit dem Beleuchtungsprinzip nach *Köhler* (s. Abschn. 6.2.1.) realisieren.

Polare

Das Auflichtpolarisationsmikroskop stellt höhere Anforderungen an die Polare als das entsprechende Durchlichtmikroskop, weil jene ebenfalls in gewissem Maße elliptisch polarisiertes Licht erzeugen können, für das das Auflichtpolarisationsmikroskop wesentlich empfindlicher als das Durchlichtpolarisationsmikroskop ist. Bei dem technischen Stand der Produktion von Polarisationsfiltern gibt es keine ernsthaften Gründe, die deren Anwendung im Auflichtpolarisationsmikroskop verhindern. Zumindest als Analysator wird vorzugsweise ein Filterpolar verwendet. Als Polarisator kann vorteilhaft ein Prismenpolar angewendet werden, dessen neutrale Transmission und höhere Lichtdurchlässigkeit bei Farbbestimmungen günstig sind; eine Aperturbeschränkung durch den Polarisator ist wegen der genannten Forderungen nicht zu erwarten. Sind die Polare mit Deckplatten versehen, so ist peinlich darauf zu achten, daß diese keine Spannungsdoppelbrechung aufweisen oder eine solche (gegebenenfalls durch die Klemmvorrichtung) induziert bekommen. Diese würde unweigerlich zu einer elliptischen Polarisation des durchtretenden Lichts führen. Aus dem gleichen Grund sollen zwischen den Polaren so wenig optische Teile wie möglich liegen, und diese müssen besonders ausgesucht sein. Die zweckmäßigste Anordnung für den Polarisator ist dicht vor dem Kompensationsprisma. Einige Hersteller ordnen den dann nicht azimutal drehbaren Polarisator unterhalb des Kompensationsprismas an und brauchen damit auf dessen Spannungszustand keine Rücksicht zu nehmen. Viele Autoren lehnen jedoch diese Anordnung wegen der Nachteile für die Reflexionsmessungen ab (s. Abschnitt 6.2.5.6.).
Der Polarisator muß mit seiner Schwingungsrichtung innerhalb einer Toleranz von etwa ±3° parallel oder senkrecht zur Symmetrieebene des Kompensationsprismas liegen, wenn er vor diesem angeordnet ist. Die Kreuzung der Polare muß ebenfalls zur Darstellung reiner Anisotropieeffekte genauer als auf 0,1° durchgeführt sein (s. Justieren des Mikroskops).

Objektive

Wie die Beleuchtungseinrichtung und die Polare müssen auch die Objektive so beschaffen sein, daß sie keine Veränderungen des linearen Polarisationszustands hervorrufen. Das bedeutet anders ausgedrückt, daß diese Objektive in hervorragendem Maße frei von Spannungsdoppelbrechung sein müssen. Spannungsdoppelbrechung im Objektiv ruft die gleichen Fehler hervor wie eine Drehung des Analysators gegen den Polarisator [486]. Objektive für Auflichtpolarisationsmikroskope sind fast ausschließlich achromatischer Korrektion, weil für diese die genannte Bedingung leichter einzuhalten ist als für Apochromate. Thermische oder mechanische Beanspruchungen können jedoch die guten Eigenschaften eines spannungsfreien Objektivs sehr leicht ändern. Polarisationsobjektive sind daher vor beiden zu schützen (Wärmeschutzfilter verwenden, Objektive möglichst nicht längere Zeit mit den Fingern berühren, beim Objektivwechsel nicht als Speichen benutzen). Bei der heute möglichen hervorragenden Schliffqualität sollen die Objektive möglichst

geebnete Bildfelder zur bestmöglichen Wiedergabe dieser guten Schliffflächen liefern. Der günstigste Objektivtyp für das Auflichtpolarisationsmikroskop ist demzufolge der Planachromat Pol. Der Objektivsatz soll Trockensysteme mit Vergrößerungen von etwa 5 ×, 10 ×, 25 × und 50 × und Immersionssysteme mit entsprechenden Vergrößerungen sowie zusätzlich ein Objektiv 100 × enthalten.

Mikroskop

Neben den genannten Anforderungen an die Bauelemente des Auflichtpolarisationsmikroskops (Erzmikroskop) muß dieses eine Reihe weiterer Bedingungen erfüllen, soll es den modernen Untersuchungsmethoden speziell der Erzmikroskopie genügen. Hierzu gehört vor allem die Anwendbarkeit quantitativer optischer Analysenmethoden, die einen drehbaren Analysator mit hoher Ablesegenauigkeit sowie das zusätzliche Einsetzen elliptischer Kompensatoren unterschiedlicher Meßbereiche erfordern. Weiterhin soll das Mikroskop sowohl für direkte (orthoskopische) als auch für indirekte (konoskopische) Beobachtung – und dies auch und vor allem für die Objektive mit schwächerer Vergrößerung – eingerichtet sein oder die Möglichkeit zur Anwendung einer Halbschattenplatte bieten [474]. Der Analysator muß für quantitative Arbeiten nach beiden Seiten aus der gekreuzten Stellung um mindestens 45° drehbar und soll möglichst fest im Stativ eingebaut sein. Ist als Reflexionselement ein Kompensationsprisma mit geometrischer Abschattung gewählt, so soll das Mikroskop zusätzlich die Möglichkeit bieten, für Strukturuntersuchungen mit Planglas, also mit voller Auflösung, arbeiten zu können. Der Objektivwechsel soll schnell und behinderungsfrei erfolgen; dabei wird größter Wert auf die Standfestigkeit der einmal zentrierten Wechselvorrichtung gelegt. Die Zentrierung der Objektive muß so erfolgen können, daß beim Drehen des Objektivs mit dem Polarisationsdrehtisch keine größeren Mittenabweichungen als ± 3 μm auftreten.

Weiterhin soll das Erzmikroskop für Reflexions- und Mikrohärtemessungen sowie Phasen- und Interferenzkontrastverfahren ausbaufähig sein. Die Anwendbarkeit mikrofotografischer Einrichtungen sowie eingebaute lichtstarke Beleuchtung gehören fast zu den selbstverständlichen Anforderungen. Eines der modernsten Auflichtpolarisationsmikroskope, das den genannten Bedingungen vollauf entspricht, ist das vom VEB Carl Zeiss JENA hergestellte Forschungspolarisationsmikroskop AMPLIVAL pol u (Bild 6.202).

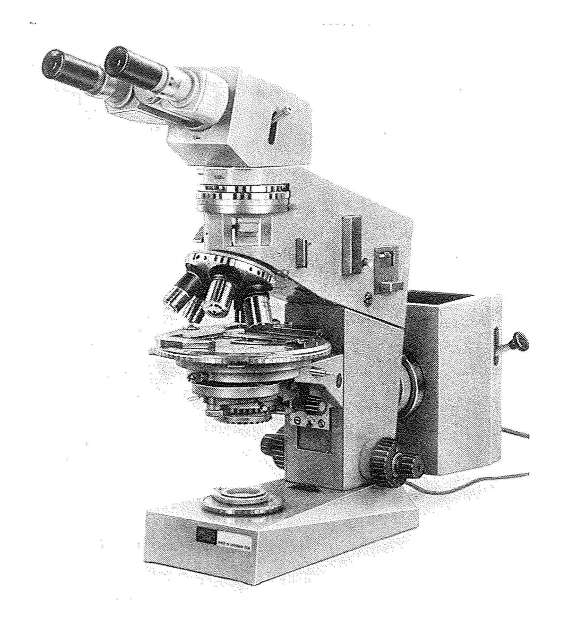


Bild 6.202. Auflichtpolarisationsmikroskop AMPLIVAL pol u
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Justieren des Mikroskops

Bei fehlerhafter Justierung der Polare oder bei auftretender Elliptizität der einfallenden Welle ändern sich sowohl die Auslöschungslagen als auch die in den Diagonallagen beobachteten Anisotropiefarben. Die zwischen aufeinanderfolgenden Auslöschungslagen meßbaren Winkel weichen von 90° ab, bis im extremen Fall nur noch zwei Auslöschungslagen auftreten. Entsprechend sind die Anisotropiefarben in den Diagonallagen ungleichwertig und verfälscht. Die Gefahr von Fehlbeobachtungen wächst mit steigender Absorption des Objekts. Dies kann andererseits zur genauen Justierung der Polare bzw. zu deren Kontrolle genutzt werden. Die Reproduzierbarkeit der Einstellung wird dann besonders gefördert, wenn der Polarisator gegen Anschlag justiert werden kann und der Analysator mit einer Winkelteilung hoher Ablesegenauigkeit ($< 6'$) versehen ist. Bei dem genannten AMPLIVAL pol u ist dies der Fall; die Polare sind ab Werk für die Nullagen von Polarisator und Analysator optimal justiert.

Bei Mikroskopen, die lediglich einen 0-Index für die Polare bei freier Drehbarkeit aufweisen, wird

die erforderliche Justierung wie folgt durchgeführt: Nachdem auf die Oberfläche eines spiegelnden Objekts fokussiert wurde, wird unter Verwendung des am Mikroskop vorgesehenen Polarisationsilluminators die Beleuchtung so geregelt, daß die Aperturblende und die Lichtquelle in die hintere Brennebene des Objektivs abgebildet werden. Die Leuchtfeldblende wird so weit geöffnet, daß ihr Bild gerade aus dem Bildfeld des Okulars verschwindet. Die Aperturblende wird so geregelt, daß ihr Bilddurchmesser einer Beleuchtungsapertur von etwa 0,12 entspricht. (Hierzu wird mit der am Mikroskop befindlichen Bertrand-Linse auf die Austrittspupille des Objektivs fokussiert und mit einem Meßokular der Durchmesser dieser Austrittspupille in Einheiten der Meßteilung gemessen. Dieser Durchmesser ist der numerischen Apertur A des verwendeten Objektivs proportional. Entsprechen n Einheiten der Meßteilung dieser numerischen Apertur A, so entsprechen x Einheiten der geforderten Beleuchtungsapertur von 0,12:

$$x = n \frac{0{,}12}{A}.$$

Dieser Wert ist für jedes Objektiv konstant und kann im Fall einer mit Teilung versehenen Aperturblende auf diese bezogen in Form einer Tabelle festgehalten werden.)

Die Aperturblende wird danach – wieder unter Kontrolle mit der Bertrand-Linse – so zentriert, daß ihr Bild zentrisch zur Objektivöffnung liegt (Foster- oder Vickers-Illuminator) oder gerade die die Objektivöffnung abschattende Kante des Kompensationsprismas berührt.

Nun wird der Polarisator in die bezeichnete Nullstellung gebracht und der Analysator unter Beobachtung eines isotropen Objekts, wie Bleiglanz oder Ferrosilizium, bis zur größten Dunkelheit des Präparats gedreht. Befriedigt die Auslöschung noch nicht, wird der Polarisator einen geringen Betrag gedreht und der Analysator entsprechend nachgestellt. Dies wird so lange wiederholt, bis das Objekt möglichst neutral schwarz erscheint. Eine empfindliche Nachjustierung erfolgt unter Beobachtung eines Anschliffs von Rotnickelkies. Die Polare werden um kleinste Beträge so weit verstellt, bis die vier Auslöschungslagen des Rotnickelkieses um $90 \pm 2^\circ$ auseinanderliegen; das bedeutet Kreuzung der Polare auf $0{,}1^\circ$ genau. Nach dieser Justierung sollen die in den Diagonallagen des Objekts beobachteten Anisotropiefarben jeweils den gleichen Charakter aufweisen. Ist das nicht der Fall, so ist noch eine wirksame Spannungsdoppelbrechung im Gerät, meist im Objektiv. Man prüft das durch azimutales Drehen des Objektivs und bringt es in seine optimale Stellung, in der selbst kleinste Restspannungen unwirksam werden. In dieser optimalen Stellung sind keine Unterschiede der Anisotropiefarben in den verschiedenen Diagonallagen des Objekts mehr sichtbar. Ein besonders empfindliches Testobjekt hierzu ist Kupferkies. Nach einer Objektivdrehung ist der Analysator nochmals nachzujustieren.

6.2.4.3. Bestimmungen mit dem Auflichtpolarisationsmikroskop

Reflexion – Bireflexion – Farbe – Härte

Anisotrope Objekte zeigen beim Drehen gegen das Polarisationsazimut des auffallenden Beleuchtungsbündels eine mehr oder weniger starke Intensitäts- oder Farbänderung, weil sich das Reflexionsvermögen dieser Objekte in Abhängigkeit von der Einfallsrichtung des Lichts zwischen zwei Extremwerten, den uniradialen Reflexionen R_1 und R_2, ändert. Die Differenz zwischen beiden ist die Bireflexion. Höhe des Reflexionsvermögens, Stärke und Wellenlängenabhängigkeit der Bireflexion sowie die Farbe des Objekts bei Beleuchtung mit natürlichem Licht sind diagnostisch wichtige Charakteristika der untersuchten Substanz. Die quantitative Bestimmung von Reflexionsvermögen und Bireflexion erfolgt mit einer Fotometereinrichtung (s. Abschn. 6.2.5.).

An Korngrenzen ist oft eine Lichtlinie zu beobachten, die an den Grenzen von Strukturen unterschiedlicher Härte auftritt. Diese Schneiderhöhn-Linie kann in Analogie zur Beckeschen Linie zur Unterscheidung verschiedenartiger Phasen aufgrund ihrer Schleifhärte herangezogen werden. Beim Vergrößern des Abstands Objekt – Objektiv wandert die Lichtlinie in das weichere Material. Die Empfindlichkeit der Methode kann durch Anwendung des Phasenkontrastverfahrens gesteigert werden [483].

Das Prinzip der Mikrohärteprüfung isotroper und anisotroper Körper ist im Abschn. 6.2.6. beschrieben. Wegen der Lastabhängigkeit der Mikrohärte empfiehlt die Commission on Ore Microscopy in der International Mineralogical Association als Standardprüfkraft 1 N, ein Wert, der fraglos für die meisten Erzmineralien zu hoch liegt und einer Korrektur bedarf. Bei beliebig orientierten Kristallen wird ähnlich wie bei Reflexionsmessungen der Bereich der gemessenen Härtewerte angegeben. Für Mineralien mit großer

Härteanisotropie sollen die Härtewerte sowohl parallel als auch senkrecht zur Längsachse des Kristalls angegeben werden. Eine Abhängigkeit der Meßwerte vom Polierprozeß über die normale Streubreite hinaus wurde nicht beobachtet [473].

Anisotropie

Qualitative Bestimmungen

Die Lichtintensität einer gegebenen Wellenlänge, die nach der Reflexion linear polarisierten Lichts an anisotropen Objekten den Analysator passiert, ist von den absoluten Werten der uniradialen Reflexionen R_1 und R_2, von deren Verhältnis und der Phasendifferenz zwischen den beiden reflektierten Komponenten abhängig. Sie ist um so größer, je größer die genannten Werte sind. Da diese mit den n_v und k_v stark mit der Wellenlänge des Lichts variieren, erscheint ein anisotroper Kristall bei Beleuchtung mit weißem Licht und Beobachtung zwischen gekreuzten Polaren meist farbig (Bild 6.203). Diese Anisotropiefarbe ist als Mischfarbe charakteristisch für den absorbierenden Kristall. Die beim Drehen des Objekts auftretende anisotrope Aufhellung kann in ihrer Stärke abgeschätzt und ebenfalls als Diagnostikum verwendet werden. Geringe anisotrope Aufhellungen lassen sich durch Anwendung eines Immersionsobjektivs um mehr als das Doppelte verstärken, da A_+ von n_0^2 abhängig ist.

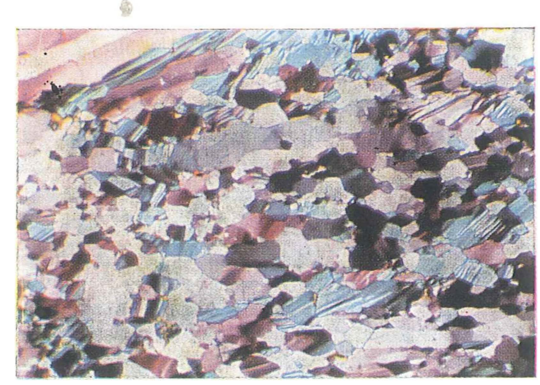


Bild 6.203. Polierter Anschliff eines anisotropen Objekts (Stibnit) bei Auflichtbeleuchtung mit gekreuzten Polaren
M 250:1

Bild 6.204. Innenreflexe (rot) in einem Rutilkristall, polierter Anschliff, Auflichtbeleuchtung, gekreuzte Polare
M 160:1



Bei Mineralien schwächerer Reflexion und Absorption kann das auffallende Licht noch in eine gewisse Tiefe eindringen, wird dort an Spaltrissen oder Einschlüssen reflektiert und ergibt die sog. Innenreflexe (Bild 6.204). Diese sind bei gekreuzten Polaren infolge Auslöschung der Oberflächenreflexion besonders gut sichtbar und werden durch Anwendung einer Immersion verstärkt. Da die Innenreflexe in der Farbe erscheinen, die das Mineral in ganz dünnen Schichten aufweisen würde, haben sie für die Diagnose einen hohen Wert.

Anisotropiemessung nach *Berek*

Die Messung der anisotropen Aufhellung erfolgt durch Bestimmung der Ellipsenparameter ψ und ϑ. Mit einem drehbaren Kompensator des Gangunterschieds R_K wird die von der Probe reflektierte elliptische Schwingung in eine lineare zurückgeführt. Das Azimut dieser wiederhergestellten linearen Schwingung weicht von dem der einfallenden Welle ab; zur Auslöschung dieser Schwingung ist also eine Analysatordrehung erforderlich. Aus den Drehwinkeln von Kompensator und Analysator können ψ und ϑ berechnet werden.

Die Messungen können an solchen Mikroskopen durchgeführt werden, die einen drehbaren Analysator mit Meßteilung (u. U. im Wrightschen Okular) haben und in deren Tubusschlitz ein entsprechender Meßkompensator eingeschoben werden kann. Am geeignetsten sind die Kompensatoren, deren Gangunterschied etwa $\lambda/6$ beträgt [472].

Die verwendeten Meßmittel sollen so beschaffen sein, daß sich bei Drehung von Analysator und Kompensator entgegen dem Uhrzeigersinn steigende Gradzahlen ergeben und bei den erforderlichen Messungen keine Einstellungen beiderseitig der 0-Marke vorkommen. Beim AMPLIVAL pol u wird dies durch Benutzung eines zweiten,

besonders für diese Aufgabe angebrachten Nonius erfüllt.
Das zu messende Objekt wird nach – am besten bei indirekter Beobachtung und geschlossener Bildfeldblende – ermittelter Auslöschungslage in eine der beiden Diagonallagen gebracht. Der Kompensator wird dann so eingeschaltet, daß die meist markierte Schwingungsrichtung n_y senkrecht zur Schwingungsrichtung des auf den Anschliff treffenden Strahlenbündels liegt, und bis zur optimalen Verdunklung des Objekts gedreht. Durch abwechselndes Drehen von Analysator und Kompensator werden für beide die Kompensationslagen ermittelt, bei denen das Objekt maximal dunkel erscheint. Auch hier bringt die indirekte Beobachtung eine wesentliche Steigerung der Einstellsicherheit.
Die so ermittelten Werte A_1 (Analysatorstellung) und K_1 (Kompensatorstellung) werden ergänzt durch die entsprechenden Werte A_2 und K_2, die in der zweiten Diagonallage des Prüflings nach dessen Drehung um 90° bestimmt werden. Die gesuchten Ellipsenparameter ergeben sich dann zu

$$\psi = \left(\frac{A_1 - A_2}{2} - \frac{K_1 - K_2}{2}\right) C + \frac{K_1 - K_2}{2}$$

$$\vartheta = \left(\frac{A_1 - A_2}{2} - \frac{K_1 - K_2}{2}\right) S,$$

wobei $C = \cos 2\pi\,(R_K/\lambda)$ und $S = \sin 2\,\pi\,(R_K/\lambda)$ den Gangunterschied R_K des verwendeten Kompensators und die Wellenlänge λ des benutzten monochromatischen Lichts berücksichtigen. Die weitere Verarbeitung von ψ und ϑ zum Bestimmen von A_+, n_ν und k_ν wurde bereits im Abschnitt 6.2.4.1. angegeben.

Anisotropiemessungen nach *Hallimond*

Die gegenüber der vorstehend genannten Berek-Methode vereinfachte Messung ermittelt für diagnostische Zwecke direkt den Winkel A_R zwischen der Schwingungsrichtung der einfallenden Welle und der großen Halbachse der reflektierten Schwingungsellipse. Da dieser Wert von der kristallografischen Orientierung der geprüften Fläche abhängig ist, wird als mineralcharakteristisch der bei Körnern mit verschieden starkem Anisotropieeffekt auftretende maximale Winkel angesehen. Als zusätzliches Charakteristikum wird die Dispersion von A_R angegeben.
Die Messung erfolgt ebenfalls in der Diagonallage des Objekts durch Drehen des Analysators bis zur maximalen Verdunklung des geprüften Details. Der Betrag der Analysatordrehung gibt direkt den Wert von A_R. Durch Anwendung einer Halbschattenplatte wird die Meßgenauigkeit verbessert. Das zu messende Korn wird auf die Trennlinie der Halbschattenplatte nach *Bertrand* oder *Nakamura* abgebildet (z. B. in der Dingebene eines Wrightschen Okulars) und der Analysator gedreht, bis die beiden von der Halbschattenplatte getrennten Kornanteile gleiche Dunkelheit zeigen.

Bestimmung der Kristallsymmetrie aus optischen Messungen

Anisotropiemessungen nach *Berek* liefern in den Kompensationslagen die Werte A_1 und A_2 für den Analysator sowie K_1 und K_2 für den Kompensator. Sind A_0 und K_0 die mit einem isotropen Objekt ermittelten Nullagen von Analysator und Kompensator, so gelten als Symmetriebedingungen

$$\frac{A_1 + A_2}{2} = A_0 \qquad \frac{K_1 + K_2}{2} = K_0$$

für Kristalle der dimetrischen Gruppe und Vorzugsrichtungen in Kristallen der trimetrischen Gruppe. Solange die Abweichungen unter etwa 0,3° bleiben, können diese Bedingungen als erfüllt angesehen werden. Stärkere Abweichungen auch nur einer der beiden Bedingungen deuten auf einen Kristall der trimetrischen Gruppe.
Eine weitere Unterscheidung gibt der charakteristische Winkel τ, der aus der Beziehung

$$\tan\tau = \frac{\vartheta}{\psi}$$

hervorgeht. Für alle Anschliffrichtungen eines einachsigen Kristalls behält τ Vorzeichen und Größe bei, variiert dagegen bei niedersymmetrischen Kristallen zwischen +90 und −90° mit der Anschliffrichtung. Da τ sehr vom Schleifprozeß beeinflußt wird, soll dieser Winkel zum Bestimmen der Symmetrie nur an verschiedenen Körnern des gleichen Materials innerhalb von ein und demselben Anschliff verwendet werden.

Darstellung magnetischer Elementarbereiche

Beim Vorhandensein einer Magnetisierung normal zur Oberfläche lassen sich die magnetischen Domänen bei senkrechtem Lichteinfall darstellen. Dabei ist der Bildkontrast von der Lage der Magnetisierungsrichtungen in benachbarten Bereichen abhängig. Der Kontrast kann bei gleich großer, aber entgegengesetzter Drehung der benachbarten Domänen beeinflußt werden, wenn mit einem Kompensator mit veränderlichem Gangunter-

schied die Drehung durch eine der beiden Komponenten (Nord- oder Südpol) aufgehoben wird. Ohne Kompensation erscheinen beide Domänenarten in der gleichen Intensität und können nicht unterschieden werden [482].

Als Kompensatoren eignen sich solche mit azimutal drehbarem Glimmerplättchen mit Gangunterschieden von $\lambda/8$ bis $\lambda/16$. Die Anwendung des polaren Effekts ist auf einachsige ferromagnetische Kristalle beschränkt, die in Richtung der kristallografischen Hauptachse Bereiche mit polarer Magnetisierung oder mit genügend großen Komponenten dieser Magnetisierung erkennen lassen.

Durch Anwendung des longitudinalen Kerreffekts lassen sich verschieden magnetisierte Bereiche optimal nur bei einem von 90° abweichenden Lichteinfallswinkel darstellen. Nach dem Fokussieren auf die bei senkrechter Beleuchtung homogen erscheinende Präparatoberfläche wird die Aperturblende so weit dezentriert, daß ihr Bild in der Austrittspupille des verwendeten mittelstarken Objektivs an deren Rand zu liegen kommt (Kontrolle mit Bertrand-Linse). Mit dem Objekttisch wird das Präparat dann so gedreht, daß die Magnetisierungslinien parallel zur Einfallsebene des Lichts verlaufen. In dieser Stellung bilden sich die magnetischen Domänen mit optimalem Kontrast ab, der u.U. durch Ändern des Einfallswinkels und der Blendengröße noch verbessert werden kann. Zur Darstellung von magnetischen Domänen mit dem transversalen Kerreffekt muß die Schwingungsebene des Polarisators um 45° gegen die Einfallsebene gedreht werden. Die hierdurch bewirkte elliptische Polarisation nach der Reflexion am Objekt macht eine Beobachtung der durch Magnetisierung erzeugten elliptischen Polarisation unmöglich. Sie muß daher durch Einfügen eines Kompensators mit definiertem Gangunterschied in eine lineare Schwingung umgewandelt werden, die vom Analysator ausgelöscht wird. Da der transversale Kerreffekt gegenüber dem longitudinalen keine Vorteile bietet, die den höheren apparativen und justiermäßigen Aufwand rechtfertigen, wird er selten angewendet.

Trotz günstigster Anordnungen des Mikroskops sind die Kontraste zwischen den Domänen wegen der stets geringen Kerr-Drehung sehr gering und erfordern zur mikrofotografischen Darstellung extrem hartes Fotomaterial. Eine Kontrastverstärkung durch Vergrößerung der magnetooptischen Kerr-Drehung wird durch Bedampfen der Probe mit einer dünnen interferenzfähigen Schicht erzeugt [487].

Ätzreaktion und mikrochemische Methoden

Unter Ätzreaktionen werden in der Erzmikroskopie die auf der polierten Mineraloberfläche hervorgerufenen Effekte zwischen Mineral und bestimmten chemischen Reagenzien verstanden. Sie unterscheiden sich damit von den mikrochemischen Reaktionen, die an pulverisiertem Material auf Glasplatten durchgeführt werden.

Ätzreaktionen können wertvolle Unterstützung anderer Bestimmungsmethoden sein, ermöglichen aber allein keine sichere Diagnose, weil die Methode verschiedene Fehlerquellen aufweist. Eine Reihe von Reaktionen verläuft sehr schwach, fehlt z.T. völlig an einem Mineral, bei dem sie sonst positiv verläuft. Weiterhin variiert die Empfindlichkeit auf chemische Reagenzien sowohl mit der Zusammensetzung als auch mit der Orientierung des getesteten Minerals. Trifft das Ätzmittel gleichzeitig mehrere Körner ungleichen Materials, kann infolge Potentialdifferenz eine Elektrolyse auftreten, die den Ätzeffekt entscheidend beeinflußt. Es darf daher stets nur ein Korn allein getroffen werden (Auftragen der Flüssigkeit mit einer kleinen Platinöse).

Die Kontrolle des Ätzprozesses erfolgt unter mikroskopischer Beobachtung mit einem Objektiv mit großem Arbeitsabstand. Der Prozeß kann im günstigen Moment gestoppt und durch Abspülen der Ätzflüssigkeit mit destilliertem Wasser aus einer Pipette beendet werden. Die Ätzzeit wird in der Regel mit 1 min angesetzt, lediglich bei Verwendung von Salpetersäure mitunter auf 2 min verlängert. Das geätzte Mineral und seine Veränderungen werden beobachtet, während die Ätzstelle noch naß ist. Umfangreiche Bestimmungstafeln werden u.a. von *Short* [488a] angegeben. Es werden folgende Reagenzien benutzt:

HNO_3 1 : 1 (Dichte der Salpetersäure 1,42)
HCl 1 : 1 (Dichte der Salzsäure 1,19)
KCN 20%ige wäßrige Lösung (Masse-%)
$FeCl_3$ 20%ige wäßrige Lösung (Masse-%)
KOH 40%ige wäßrige Lösung (Masse-%)
$HgCl_2$ 5%ige wäßrige Lösung (Masse-%)
Königswasser (3 Teile HCl, konz. auf 1 Teil HNO_3, konz.)
H_2O_2 handelsüblich.

Das Verhalten des Minerals gegenüber diesen Reagenzien wird als positiv oder negativ beurteilt, je nachdem, ob es angegriffen wird oder nicht. Mit diesen Beobachtungen, ergänzt durch eine eventuell auftretende Gasentwicklung, kann aus den

Bestimmungstafeln die Zuordnung vorgenommen werden.
Mit den mikrochemischen Reaktionen wird das Mineralpulver auf das Vorhandensein ein oder mehrerer unbekannter Elemente geprüft. Zum Prüfen auf diese Elemente werden Reagenzien gewählt, die das gesuchte Element in Form von Kristallen von charakteristischer Form und Farbe ausfällen.
Der Vorteil mikrochemischer Reaktionen liegt in der Einsparung von Zeit und Material. Die Reaktionen werden auf einer Glasplatte ausgeführt und unter dem Mikroskop beobachtet.
Das zu untersuchende Pulver wird mit einem Mikromeißel aus der Anschlifffläche herausgekratzt oder mit einem Objektmarkierer herausgebohrt [480] und mit einem schwach angefeuchteten Holzspan aufgenommen.
Die mikroskopische Kontrolle dieser Prozedur sichert, daß das Material frei von Fremdsubstanz ist. Der Span wird dann in einen auf dem gesäuberten Objektträger befindlichen Tropfen Salpetersäure 1 : 1 oder anderer geeigneter Flüssigkeit getaucht, wodurch sich das aufgenommene Pulver absetzt und in Lösung geht. Die Säure wird über einem Mikrobrenner verdampft und der Rückstand unter dem Mikroskop geprüft, ob er noch ursprüngliche Bestandteile enthält. Der Vorgang ist so lange zu wiederholen, bis das ganze Material gelöst ist. Der verbliebene Rückstand wird in verdünnter Salpetersäure nach jeweiliger Vorschrift gelöst und mit dem flüssigen oder festen Reagens in Verbindung gebracht.
Ausführliche Methoden unter besonderer Berücksichtigung der bei Erzmineralien vorliegenden Elementkombinationen sind von *Short* [488a] angegeben.

Messung von n und k bei schiefer Inzidenz

Fällt linear polarisiertes Licht, dessen Schwingungsebene zur Einfallsebene einen Winkel von 45° bildet, unter verschiedenen Einfallswinkeln auf ein absorbierendes Medium, so ist ein Einfallswinkel dadurch gekennzeichnet, daß die Hauptachsen der reflektierten Schwingungsellipse parallel und senkrecht zur Lichteinfallsebene liegen. Dieser Winkel wird als Haupteinfallswinkel bezeichnet. Er nimmt Werte zwischen 70 und etwa 80° an. Die Einstellempfindlichkeit ist relativ gering.
Das von *Drude* entwickelte Meßverfahren zum Bestimmen von n und k arbeitet mit dem Haupteinfallswinkel unter Verwendung eines Goniometers. *Berek* hat dieses Verfahren für mikro-

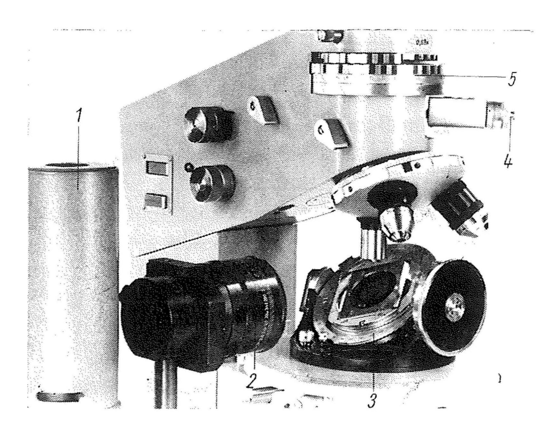


Bild 6.205. Prinzipaufbau der Meßeinrichtung zur Ermittlung von n und k bei schiefer Inzidenz am AMPLIVAL pol u
VEB Carl Zeiss JENA Werkfoto
1 Spektrallampe; *2* drehbarer Polarisator mit Gradeinteilung und eingebauter Kollektorlinse; *3* Universaldrehtisch (2achsig) für Auflicht; *4* Meßkompensator mit azimutaler Drehung; *5* Meßanalysator mit Teilung und Nonius

skopische Objekte abgewandelt und den hierfür bequemeren Einfallswinkel von 45° gewählt. Der gesteigerte Einfluß von Meßfehlern bei diesem Einfallswinkel wird weitgehend dadurch kompensiert, daß der Einfluß von Oberflächenschichten bei diesem Winkel wesentlich geringer als beim Haupteinfallswinkel ist.
Der Anschliff mit dem zu messenden Korn wird mit einem Universaldrehtisch für Auflicht um 45° zur Mikroskopachse geneigt (Bild 6.205). Die Beleuchtung geschieht mit einer Spektrallampe oder einer Glühlampe mit Monochromator senkrecht zur Mikroskopachse. Zwischen Lichtquelle und Objekt wird ein Polarisator so angeordnet, daß seine Schwingungsrichtung 45° zur Lichteinfallsebene liegt. Dieses Azimut σ_E kann von 45° abweichen, muß aber dann genau bekannt sein. Die Nullage des Polarisators wird wie üblich durch die Auslöschung eines absorbierenden isotropen Objekts bei gekreuzten Polaren ermittelt. Zwischen Objekt und Analysator wird ein azimutal drehbarer Meßkompensator angeordnet. Dessen Gangunterschied wird am besten kleiner als $\lambda/4$ gewählt; der absolute Wert geht in das Meßverfahren von *MacCullagh* nicht ein.
Zur Messung von n_1, n_2, k_1, k_2 und daraus erfolgenden Berechnung von R_1 und R_2 (s. Abschnitt 6.2.5.) an anisotropen Objekten werden hintereinander die Hauptschwingungsrichtungen des Objekts parallel zur Einfallsebene angeordnet (Auslöschungslagen bei gekreuzten Polaren mit

$\sigma_E = 0$). Die bei beliebigem σ_E eintretende Aufhellung wird durch sukzessives Verdrehen von Kompensator und Analysator bis zur Auslöschung kompensiert; es werden die zugehörigen Meßwerte K_1 und A_1 abgelesen. Für die gleiche Objektlage gibt es beim Verfahren von *MacCullagh* noch eine zweite Kompensationslage K_2, A_2 (wobei A_0 zwischen A_1 und A_2 liegt). Aus diesen Werten und der Nullage des Kompensators K_0 ergibt sich

$$\cos 2\vartheta_\nu = \frac{\sin[(K_2 - K_1) - (A_2 - A_1)]}{\sin(K_2 - K_1)}$$

$$\cos 2\psi_\nu = \sin[(K_1 - K_0) + (K_2 - K_0)]$$

($\nu = 1{,}2$ für die beiden Lagen der Hauptschwingungsrichtungen relativ zur Einfallsebene entsprechend den Extremwerten von n und k in dieser Schnittlage).

Das Azimut $\varkappa_\nu$ der wiederhergestellten linearen Schwingung in bezug auf die Einfallsebene ergibt sich aus

$$\cos 2\varkappa_\nu = \cos 2\psi_\nu \cos 2\vartheta_\nu$$

und die Phasendifferenz Δ_ν der reflektierten Komponenten aus

$$\cos \Delta_\nu = \frac{\tan 2\psi_\nu}{\tan 2\varkappa_\nu}.$$

Über die Hilfsgrößen

$$a_\nu = \frac{\tan^2 \varkappa_\nu - \tan^2 \sigma_\varepsilon}{\tan^2 \varkappa_\nu + \tan^2 \sigma_E + 2 \tan \varkappa_\nu \tan \sigma_E \cos \Delta_\nu}$$

und

$$b_\nu = \frac{2 \tan \varkappa_\nu \tan \sigma_E \sin \Delta_\nu}{\tan^2 \varkappa_\nu + \tan^2 \sigma_E + 2 \tan \varkappa_\nu \tan \sigma_E \cos \Delta_\nu}$$

sowie

$$A_1 = \frac{a_1}{a_1^2 + b_1^2}; \quad A_2 = \frac{a_2}{a_2^2 + b_2^2}$$

$$B_1 = -\frac{b_1}{a_1^2 + b_1^2}; \quad B_2 = -\frac{b_2}{a_2^2 + b_2^2}$$

wird

$$n_1 = \frac{3}{2}\sqrt{2}\,\frac{2A_1 + A_2}{(2A_1 + A_2)^2 + (2B_1 + B_2)^2}$$

$$k_1 = \frac{3}{2}\sqrt{2}\,\frac{2B_1 + B_2}{(2A_1 + A_2)^2 + (2B_1 + B_2)^2}$$

$$n_2 = \frac{3}{2}\sqrt{2}\,\frac{A_1 + 2A_2}{(A_1 + 2A_2)^2 + (B_1 + 2B_2)^2}$$

$$k_2 = \frac{3}{2}\sqrt{2}\,\frac{B_1 + 2B_2}{(A_1 + 2A_2)^2 + (B_1 + 2B_2)^2},$$

Die Methode kann auch auf isotrope absorbierende oder auf durchsichtige Kristalle angewendet werden.

6.2.5. Auflichtmikroskopfotometrie

von Ing. *Joachim Bergner*

6.2.5.1. Reflexion und Remission

Trifft Licht der Wellenlänge λ und der Intensität I_0 aus einem durchsichtigen Medium mit der Brechzahl n_0 kommend auf ein anderes Medium (Brechzahl n_λ) mit glatter, ebener Oberfläche, so wird an der Grenzfläche ein Teil I_R des auftreffenden Lichts reflektiert. Als spektrales Reflexionsvermögen R_λ bezeichnet man das Verhältnis der reflektierten zur einfallenden Lichtintensität:

$$R_\lambda = \frac{I_R}{I_0}.$$

Bei senkrechtem Lichteinfall auf nichtabsorbierende Medien gilt

$$R_\lambda = \frac{(n_\lambda - n_0)^2}{(n_\lambda + n_0)^2} \quad (\textit{Fresnel}). \qquad (6.49)$$

Für den allgemeinsten Fall der Reflexion an absorbierenden optisch anisotropen Medien ist das Reflexionsvermögen vom Azimut der einfallenden linear polarisierten Lichtwelle abhängig. Die für die Praxis bedeutungsvollen Extremwerte für den Lichteinfall parallel bzw. senkrecht zu einer Hauptschwingungsrichtung des anisotropen Mediums werden als uniradiale Reflexionen R_1 und R_2 bezeichnet:

$$R_1 = \frac{(n_1 - n_0)^2 + k_1^2}{(n_1 + n_0)^2 + k_1^2} \qquad (6.50\,a)$$

$$R_2 = \frac{(n_2 - n_0)^2 + k_2^2}{(n_2 + n_0)^2 + k_2^2} \quad (\textit{Beer}). \qquad (6.50\,b)$$

Dabei bedeuten n_1 und n_2 die Brechzahlen des reflektierenden Mediums für die Hauptschwingungsrichtungen, k_1 und k_2 die zugehörigen Absorptionskoeffizienten und n_0 die Brechzahl des angrenzenden Mediums. Die Differenz

$$\Delta R = |R_1 - R_2| \qquad (6.51)$$

wird als Bireflexion (schlechter: Reflexionspleochroismus) bezeichnet, das arithmetische Mittel

$$\bar{R} = \frac{R_1 + R_2}{2}$$

als mittleres Reflexionsvermögen.
Ist die Grenzfläche zwischen den beiden Medien rauh, so wird das reflektierte Licht zerstreut (diffuse Reflexion oder Remission). Für vollkommen diffus reflektierende (remittierende) Flächen gilt angenähert das Lambertsche Kosinusgesetz, nach dem die Leuchtdichte der diffus strahlenden Fläche unabhängig von der Richtung ist, von der aus sie gesehen wird.

6.2.5.2. Aufbau und Wirkungsweise von Mikroskopfotometern für die Messung des Reflexionsvermögens

Visualfotometer

Die Messung des Reflexionsvermögens R erfolgt bei den Visualfotometern durch einen Vergleich der von der Probe bei senkrechter Inzidenz reflektierten Lichtintensität mit einer meßbar veränderlichen Lichtintensität im Dingfeld des Mikroskopokulars. Die Vereinigung der beiden Lichtintensitäten erfolgt hier in der Form, daß das Zentrum des zu messenden Objektdetails abgeblendet und die Vergleichsintensität eingespiegelt wird (Bild 6.206). Zum Messen werden beide Lichtanteile mit einem Regelglied auf gleiche Intensität gebracht. Das Regelglied besteht bei dem dargestellten Fotometer aus drei Polaren, wovon die beiden äußeren mit ihren Schwingungsrichtungen fest und parallel zueinander liegen und der mittlere drehbar ist. Damit wird die Vergleichsintensität I_v der vierten Potenz des Sinus vom Drehwinkel Θ proportional

$$I_V = f \sin^4 \Theta .$$

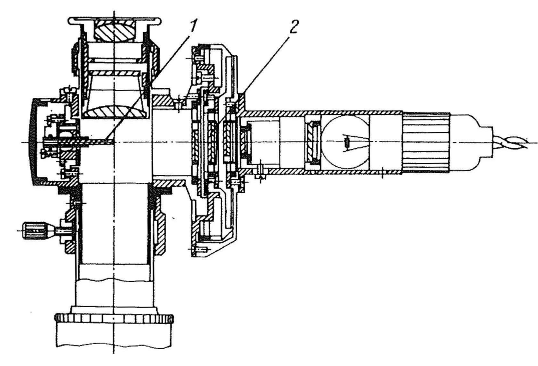


Bild 6.206. Schnitt durch das Mikrofotometer
Firma Cooke, Troughton & Simms (aus Firmendruckschrift DM 7550)
1 Reflektor für Vergleichsintensität; *2* Regelglied

Zum Bestimmen des Reflexionsvermögens einer unbekannten Probe sind drei Messungen erforderlich:

1. I_{VS} für die unbekannte Probe mit dem Reflexionsvermögen R_S,
2. I_{VE} für die Standardprobe mit bekanntem R_E,
3. I_{VG} ohne Objekt zum Eliminieren des Streulichts (s. Abschn. 6.2.5.6.).

Aus diesen Messungen ergibt sich

$$R_S = R_E \frac{I_{VS} - I_{VG}}{I_{VE} - I_{VG}} .$$

Lichtelektrische Fotometer

Visualfotometer erfordern eine Mindestobjektgröße zum Bestimmen des Reflexionsvermögens. Entsprechend der Konstruktion des Fotometerwürfels können Objektgrößen von 20 bis 50 µm kaum unterschritten werden. Der Wunsch nach kleineren Meßfeldern und höherer Reproduzierbarkeit der Meßwerte führte zur Anwendung von lichtelektrischen Fotometern.
Das Reflexionsvermögen wird mit diesen Geräten durch einen objektiven Vergleich der bei senkrechter Lichtinzidenz reflektierten und von einem geeigneten Anzeigegerät registrierten Lichtintensitäten der Probe und eines Standards gemessen. Dabei kann dieser Vergleich prinzipiell zeitlich getrennt (Einstrahlgeräte) oder gleichzeitig (Zweistrahlgeräte) erfolgen. Beide Gerätetypen sind vorwiegend im Baukastensystem aus folgenden Baueinheiten aufgebaut:

1. Beleuchtungseinrichtung
2. Auflicht-(Polarisations-)Mikroskop
3. lichtelektrischer Empfänger
4. Anzeigegerät.

Die heute erhältlichen Reflexionsmikroskopfotometer sind hauptsächlich Einstrahlgeräte. Die von der Lichtquelle ausgestrahlte Intensität darf über einen Zeitraum von mehreren Stunden nur weniger als ±0,5% schwanken.
Voraussetzungen für diese Stabilität sind ein geeigneter Konstanthalter zur Energieversorgung der Lampe und eine Energieübertragung über einwandfreie Kontakte. Steckverbindungen sind wegen des Auftretens variabler Übergangswiderstände ungeeignet; Löt- oder Schraubverbin-

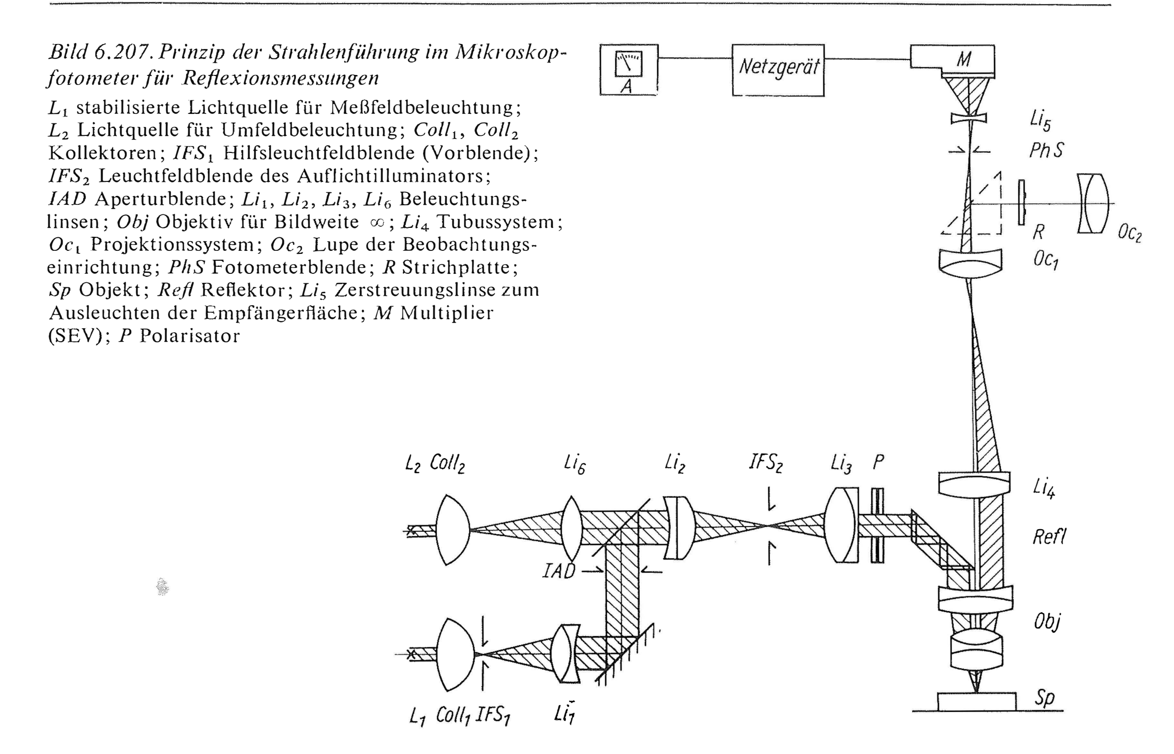


Bild 6.207. Prinzip der Strahlenführung im Mikroskopfotometer für Reflexionsmessungen

L_1 stabilisierte Lichtquelle für Meßfeldbeleuchtung; L_2 Lichtquelle für Umfeldbeleuchtung; $Coll_1$, $Coll_2$ Kollektoren; IFS_1 Hilfsleuchtfeldblende (Vorblende); IFS_2 Leuchtfeldblende des Auflichtilluminators; IAD Aperturblende; Li_1, Li_2, Li_3, Li_6 Beleuchtungslinsen; *Obj* Objektiv für Bildweite ∞; Li_4 Tubussystem; Oc_1 Projektionssystem; Oc_2 Lupe der Beobachtungseinrichtung; *PhS* Fotometerblende; *R* Strichplatte; *Sp* Objekt; *Refl* Reflektor; Li_5 Zerstreuungslinse zum Ausleuchten der Empfängerfläche; *M* Multiplier (SEV); *P* Polarisator

dungen sind vorzuziehen. Vor Beginn der Messungen muß die Lampe im thermischen Gleichgewicht sein. Hierfür reicht eine Einlaufzeit von 10 bis 15 min aus.

Die verwendete Lichtquelle muß bei genügend großer Strahlungsleistung eine gute zeitliche und räumliche Konstanz der Strahlung aufweisen. Gasentladungslampen erfüllen in der Regel diese Bedingungen nicht. Am besten eignen sich Hochleistungs-Niedervoltglühlampen (12 V, 50 bis 100 W), wobei den Halogenlampen (Quarz-Jod-Lampen) gegenüber den normalen Glühlampen unbedingt der Vorzug zu geben ist. Bei ihnen ist kaum eine Schwärzung des Kolbens über einen längeren Zeitraum festzustellen, während z. B. die Lichtwurflampe S 1 (s. Tafel 5.1) bereits über eine Brenndauer von 8 h aufgrund von Kolbenschwärzung einen merklichen Intensitätsabfall aufweist.

Eine der Voraussetzungen für richtige und reproduzierbare Reflexionsmessungen ist eine zweckentsprechende und reproduzierbare Führung des Beleuchtungsstrahlengangs; es muß in jedem Fall das Beleuchtungsprinzip nach *Köhler* eingehalten werden (Bild 6.207). Dabei ist zu beachten, daß das beleuchtete Feld zur Vermeidung des Schwarzschild-Villiger-Effekts dem gemessenen möglichst anzugleichen ist. Die Leuchtfeldblenden IFS_2 normaler Auflichtbeleuchtungseinrichtungen lassen sich hierzu nicht genügend weit schließen, so daß in einer dieser Blende konjugierten Ebene der Beleuchtungseinrichtung entsprechend kleinere Hilfsblenden IFS_1 angeordnet sind, die über ein fokussierbares Hilfssystem Li_1 in die Objektebene abgebildet werden. Bei Auflichtfotometern, bei denen generell das Objektiv gleichzeitig auch Kondensor ist, variiert die Größe der erforderlichen Vorblende nur mit dem Abbildungsmaßstab des Projektionssystems Oc_1, wenn – wie allgemein üblich – in der zweiten Bildebene des Objekts gemessen wird. Im Idealfall soll das Bild der Vorblende im zu messenden Objekt so groß sein, daß es von diesem vollkommen bedeckt wird (Bild 6.208). Dadurch kann kein Streulicht von Objektdetails mit anderem Reflexionsvermögen auf den Empfänger fallen. Meßreihen haben jedoch gezeigt, daß selbst bei extremen Unterschieden im Reflexionsvermögen benachbarter Objektdetails das Leuchtfeld bis zu 5mal größer sein kann als das vom zu messenden Objekt gerade bedeckte Meßfeld (Bild 6.209), ohne daß der relative Meßfehler bei der Bestimmung von R 1% überschreitet. Andererseits soll das Leuchtfeld nicht kleiner sein als das 1,6fache des Meßfelds, um bei kleinen Aberrationserscheinungen und Dejustierungen im Beleuchtungs-

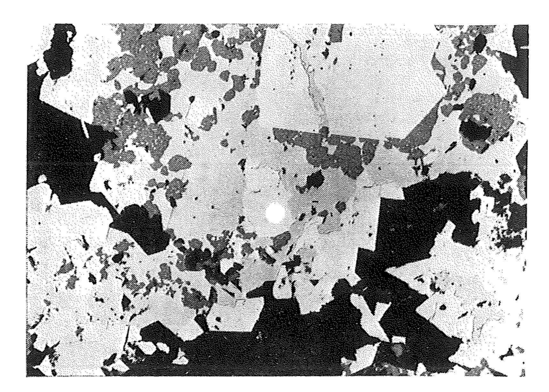


Bild 6.208. Bild der Leuchtfeldblende < Meßkorn

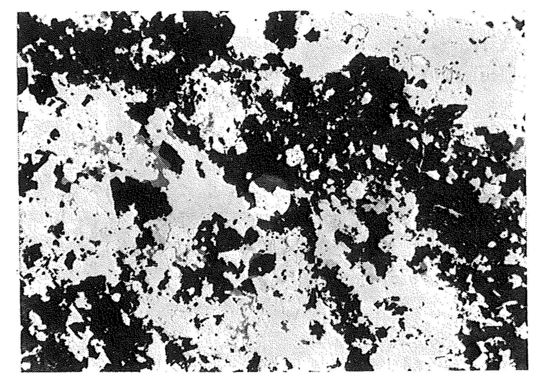
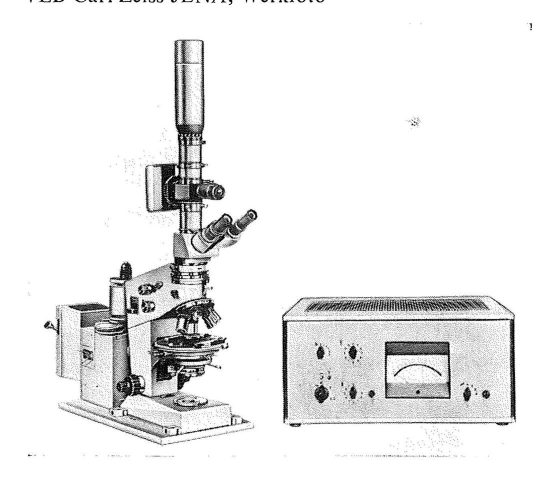


Bild 6.209. Bild der Leuchtfeldblende > Meßkorn

strahlengang keine Auswirkung auf den Meßwert zu haben.
Mit der Durchführung des exakten Köhlerschen Beleuchtungsprinzips wird auch gewährleistet, daß im Dingraum telezentrische Beleuchtung herrscht und die Apertur des Beleuchtungsstrahlenbündels den Anforderungen entsprechend geregelt werden kann.
Die Aperturblende *IAD* wird durch die Kollektoren Li_2 und Li_3 hierzu in die hintere Objektivbrennebene abgebildet. Da die Lage dieser Ebene von Objektiv zu Objektiv verschieden ist, ist beim Polarisationsmikroskop AMPLIVAL pol u des VEB Carl Zeiss JENA (Bild 6.210) das aus Li_2, Li_3 und IFS_2 bestehende optische System axial verschiebbar gestaltet, so daß jeweils optimale Verhältnisse eingestellt werden können. Die Aperturblende wird in Abhängigkeit von der Objektivapertur so weit geschlossen, daß eine Beleuchtungsapertur von 0,1 bis maximal 0,15 erreicht wird. Damit ist eine für die Praxis genügende Parallelität der Beleuchtungsstrahlen gewährleistet. Bei größeren Beleuchtungsaperturen würden aufgrund der Richtungsabhängigkeit von *R* Falschwerte resultieren.
Zum Vermessen isotroper Körper wird als Reflektor im Auflichtstrahlengang das teildurchlässige Planglas verwendet, mit dem bei exakter Justierung des Strahlengangs genau senkrechte Beleuchtung erzielt werden kann. Für die Vermessung anisotroper Körper wird das Berek-Prisma angewendet; die Aperturblende ist dabei so zu justieren, daß ihr entsprechend $A = 0{,}10$ bis 0,15 eingestelltes Bild die Prismenkante gerade berührt. Der dadurch entstehende Neigungswinkel des auf das Objekt fallenden Strahlenbündels zur optischen Achse des Mikroskops bewirkt einen in der Praxis nicht störenden Fehler. Wesentlich unangenehmer sind die Fehler, die bei Verwendung des Planglases aufgrund der Änderung des Polarisationszustands des Lichts auftreten. Nur das Kompensationsprisma nach *Berek* gewährleistet in Verbindung mit dem exakten Köhlerschen Beleuchtungsprinzip einen linearen Polarisationszustand und ein homogenes Polarisationsfeld und damit korrekte Messungen der uniradialen Reflexionen.
An die Objektive wird lediglich die zusätzliche Forderung gestellt, möglichst wenig Streulicht (primary glare) zu erzeugen. Objektive, bei denen das Streulicht durch polarisationsoptische Hilfsmittel beseitigt wird (s. Abschn. 6.2.1.), können zu Reflexionsmessungen an anisotropen Körpern nicht verwendet werden, weil bei ihrer Benutzung kein linear polarisiertes Licht auf die Probe fällt. Die chromatische Korrektion der verwendeten

Bild 6.210. Auflichtmikroskopfotometer auf der Basis eines Polarisationsmikroskops (AMPLIVAL pol u)
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



Objektive hat keinen entscheidenden Einfluß auf die Durchführung von Reflexionsmessungen.
Aus dem von Objektiv und Projektionssystem erzeugten Bild der Probe wird der zu messende Anteil mit der Fotometerblende *PhS* ausgeblendet.
Zur Kontrolle der Zuordnung von Blendenöffnung und zu messendem Korn werden von den verschiedenen Herstellern unterschiedliche Verfahren angewendet. Bei dem beschriebenen Mikroskop (Bild 6.210) ist der Fotometerblende in konjugierter Ebene eine Strichplatte *R* mit entsprechender Markierung zugeordnet, die ihrerseits mit einem Lupensystem Oc_2 betrachtet wird. Die Firma Reichert, Wien, verwendet eine spiegelnde Fotometerblende, die also das Umfeld der Meßprobe in ein Beobachtungssystem reflektiert. Die Firma Leitz, Wetzlar, führt eine zusätzliche Beleuchtung der regelbaren Meßblende ein, womit deren Öffnung hell auf dem Bild der Probe erscheint und eine exakte Zuordnung zu treffen ist. Zur Messung selbst wird die Blendenbeleuchtung ausgeschaltet. Zum Erzeugen monochromatischer Strahlung kann in den Beleuchtungsstrahlengang ein Monochromator oder ein Verlaufinterferenzfilter eingebaut werden. Letzteres kann auch im Abbildungsstrahlengang angeordnet sein. Dabei ergibt sich die Möglichkeit, die Monochromatorblende als Leuchtfeldblende IFS_1 oder Fotometerblende *PhS* zu verwenden. Für Messungen an Erzmineralien reichen Interferenz- oder Verlaufinterferenzfilter mit ihren Halbwertsbreiten von 6 bis 12 nm aus, wobei die mit geringerer Halbwertsbreite vorzuziehen sind.
Die von der Commission on Ore Microscopy (C.O.M.) zugelassene Bandbreite von 25 nm dürfte für viele Dispersionsmessungen bereits zu hoch sein (z.B. Covellin). Für Messungen bei festen Wellenlängen empfiehlt die C.O.M. $\lambda = 470$ (486), 546, 589 und 650 (656) nm [477].
Die meisten handelsüblichen Mikroskopfotometer verwenden als Empfänger einen Sekundärelektronenvervielfacher (SEV, Multiplier), der über ein Netzgerät mit stabilisierter Spannung versorgt wird.

6.2.5.3. Aufbau von Remissionsfotometern

Zum Messen der Remission diffus streuender Proben wird mikroskop- und empfängerseitig der gleiche Aufbau gewählt wie bei Reflexionsmessungen. Die Beleuchtung erfolgt über einen Dunkelfeldilluminator (s. Abschn. 6.2.2.) mit einseitigem oder allseitigem Lichteinfall.

6.2.5.4. Anforderungen an die Probe

Proben, an denen das Reflexionsvermögen gemessen werden soll, müssen frei von Kratzern und Poliergrübchen sein und eine ebene, relieffreie Oberfläche aufweisen. Zweckmäßig werden Ebenheit und Oberflächenqualität vor der Messung mit einer Phasen- oder Interferenzkontrasteinrichtung kontrolliert.
Von großer Bedeutung ist die Ausrichtung der Probenoberfläche senkrecht zur optischen Achse des Mikroskops. Unvollkommenheiten in dieser Justierung können erhebliche Meßfehler verursachen [479]. Das Ausrichten der Präparate mit einer Schliffpresse reicht nicht immer aus; zweckmäßig ist die Anwendung eines kippbaren Objekttisches. Ein Kriterium für ausreichende Justierung gibt die Beobachtung der Aperturblende im indirekten Strahlengang. Bei richtiger Objektlage darf die Aperturblende beim Drehen der Probe ihre Lage zur Prismenkante nicht ändern.

6.2.5.5. Reflexionsstandards

Sowohl visuelle als auch lichtelektrische Fotometer benötigen eine Eichsubstanz. Als Standardreflektoren haben sich von den natürlichen absorbierenden Mineralien besonders Bleiglanz ($R_C = 0{,}401$, $R_D = 0{,}416$, $R_e = 0{,}433$ für Luft; $R_C = 0{,}259$, $R_D = 0{,}271$, $R_e = 0{,}288$ für Zedernholzöl) und Pyrit ($R_D = 0{,}545$ für Luft) als geeignet erwiesen. Bei beiden ist *R* sowohl vom Fundort als auch vom Polierverfahren innerhalb der Fehlergrenze von $\pm$ 0,2% unabhängig [476].
Bei transparenten Standards kann *R* nach Gl. (6.49) berechnet werden. Es werden Neutralgläser ($R \approx 0{,}04$) und Karborund ($R \approx 0{,}20$) verwendet. *Rösch* empfiehlt bei Objektiven mit größerem Arbeitsabstand die Verwendung eines totalreflektierenden kleinen Prismas, auf dessen Kante das Mikroskop fokussiert wird. Das Reflexionsvermögen für ein Prisma aus optischem Glas BK 7 ist 0,918 gegen Luft und 1,00 gegen Zedernholzöl [196].
Von der C.O.M. wird weiterhin isotropes Silizium mit $R \approx 0{,}40$ als Eichnormal empfohlen.
Generell soll der zur Vergleichsmessung herangezogene Standard ein Reflexionsvermögen haben, das in der Nähe des Reflexionsvermögens der zu messenden Probe liegt, um sekundäre Streulichteffekte zu reduzieren [488].

6.2.5.6.
Meßverfahren und ihre Anwendung

Die Messung des Reflexionsvermögens erfolgt bei lichtelektrischen Fotometern durch die Messung der von der Probe (I_{Sp}) und vom Standard (I_{St}) reflektierten Intensitäten bei gleicher Geräteanordnung. Dann ist

$$R_{Sp} = R_{St} \frac{I_{Sp} - I_{Obj}}{I_{St} - I_{Obj}},$$

wenn I_{Obj} das vom Objektiv allein reflektierte Streulicht ist.

Dieses ermittelt man bei sonst gleicher Anordnung wie zur Messung von I_{Sp} und I_{St} durch Ersetzen der Probe durch einen mattschwarzen Hohlkörper, der nur eine Öffnung für das Objektiv freigibt. Bei der Verwendung von Immersionsobjektiven wird I_{Obj} so ermittelt, daß man eine mit dem Objektiv durch Immersionsöl verbundene Glasplatte neigt, bis der Galvanometerausschlag ein Minimum erreicht hat. Dieses Minimum entspricht I_{Obj} [485]. I_{Obj} wird beim Aufbau des Fotometers nach Bild 6.207 kaum registrierbar sein, weil allein die Anwendung der kleinen Leuchtfeldblende IFS_1 Streulicht und Reflexe fast völlig beseitigt (s. Abschnitt 6.2.1.).

Die Messungen werden im allgemeinsten Fall bei verschiedenen Wellenlängen des beleuchtenden Lichts durchgeführt, um die Dispersion des Reflexionsvermögens als weitere quantitative Bestimmungsgröße zu erhalten.

Im Fall anisotroper Medien wird das Reflexionsvermögen für zwei um 90° verschiedene Hauptschwingungsrichtungen gemessen. Diese sind bei einwandfrei justiertem Erzmikroskop leicht zu finden, da sie den Auslöschungsrichtungen bei gekreuzten Polaren entsprechen. Die Messung von R soll nach *Berek* so erfolgen, daß der Polarisator mit seiner Schwingungsrichtung unter 45° zur Symmetrieebene des Reflektors liegt. Nur in diesem Fall sei der gemessene R-Wert unabhängig von der Apertur des verwendeten Objektivs [196]. Aus den beiden so durchgeführten Messungen ergibt sich dann der Mittelwert der uniradialen Reflexionen. Bei korrektem Köhlerschem Beleuchtungsprinzip, Einhalten der maximalen Beleuchtungsapertur und des maximalen Einfallswinkels für den Schwerstrahl durch Justieren der Aperturblende an den Rand des Reflexionsprismas und Verwendung eben dieses Prismas als Reflektor konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Mißt man bei der beschriebenen Anordnung R in den beiden Hauptschwingungsrichtungen bei Nullstellung des Polarisators, so erhält man die uniradialen Reflexionen und aus diesen das mittlere Reflexionsvermögen.

Durch Kombination eines Reflexionsmikrofotometers mit einer Mikrohärteprüfeinrichtung entwickelten *Bowie* und *Taylor* ein System der Erzmineraldiagnose, das mehr und mehr Anwendung findet (Bild 6.211) [473].

Aus Messungen der Reflexionsvermögen R' und R'' eines Mediums für zwei angrenzende Medien unterschiedlicher Brechzahlen n' und n'' lassen sich nach dem Beerschen Gesetz Brechzahl n und Absorptionsindex $\varkappa = k/n$ berechnen. Für $n' = 1$ wird

$$n = \frac{1}{2} \frac{n''^2 - 1}{n''(1 + R''/1 - R'') - (1 + R')/(1 - R')} \tag{6.52a}$$

und

$$\varkappa = \frac{1}{n} \sqrt{\frac{(n+1)^2 R' - (n-1)^2}{1 - R'}}. \tag{6.52b}$$

Zur Bestimmung der optischen Symmetrie des untersuchten Materials aus Reflexionsmessungen wird von jedem zu untersuchenden Mineral ein Anschliff mit einer Anzahl von Körnern unterschiedlicher Orientierung hergestellt. Bei jedem Korn wird das Reflexionsvermögen in beiden Schwingungsrichtungen gemessen. Bleibt R bei allen Körnern für einen der beiden Werte gleich (Fehlergrenze $\pm 0{,}2\%$), so handelt es sich um ein wirteliges Mineral, und dieser Wert wird mit R_ω bezeichnet. Je nachdem, ob R_ω der kleinere oder größere Wert ist, nennt man das betreffende Mineral optisch positiv bzw. optisch negativ. Bei niedriger symmetrischen Mineralien sind die beiden R-Werte, unabhängig von der Kornorientierung, ungleich [475].

Da die aus ebenen Anschliffen gewonnenen R-Werte stets Zufallswerte, mineralcharakteristisch aber die Extremwerte sind, mißt *Ehrenberg* das Reflexionsvermögen an halbkugelig geschliffenen und polierten Proben mit einem U-Tisch für Auflicht und ermittelt so die Reflexionsindikatrix [478]. Weitere Anwendungen von speziellen Problemen sind den zitierten Arbeiten zu entnehmen.

6.2.6.
Bestimmung der Mikroeindruckhärte

von *Wolfgang Oettel*

Die Bestimmung dieser Härte hat sich aufgrund ihrer verhältnismäßig einfachen Durchführbarkeit zu einem Spezialgebiet der mikroskopischen

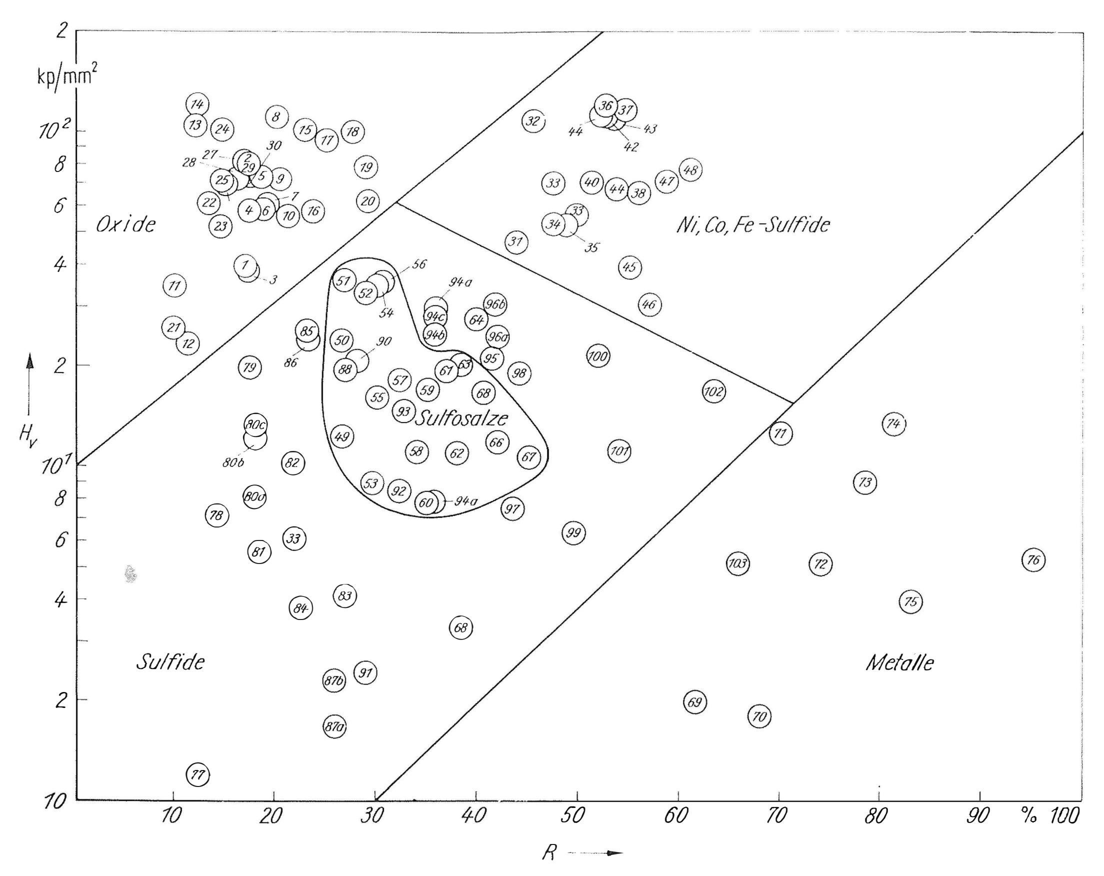


Bild 6.211. Diagramm zur Erzmineraldiagnose nach Bowie und Taylor

Untersuchungstechnik entwickelt. Ausgehend von der Metallografie, in der sie zur Unterscheidung und zur Bestimmung der einzelnen Gefügebestandteile in Legierungen, zur Untersuchung von Diffusionsvorgängen, zur Feststellung von Kristallorientierungen und zur Ermittlung der Härte dünner Überzüge und Folien Verwendung findet, hat sie sich in der Erz- und Kohlemikroskopie sowie bei der Prüfung grob- und feinkeramischer Werkstoffe bzw. von Feindrähten und Kleinstpräzisionsteilen ihren festen Platz erobert.

Da es bei der Mikroeindruckhärte darum geht, nur die Härte des Einzelkorns zu ermitteln, können die üblichen makroskopischen Prüfmethoden hier nicht angewendet werden. Am besten anpaßbar an die Sonderbedingungen haben sich die statischen Methoden und davon wieder das Härtemeßverfahren nach *Vickers* erwiesen. Dabei wird unter der Mikroeindruckhärte der Widerstand verstanden, den ein Körper, der Prüfling, dem Eindringen eines härteren Prüfkörpers, des Eindringkörpers, entgegensetzt, wobei Prüfkräfte unter 2 N angewendet werden. Selbstverständlich darf sich dabei der Eindringkörper nicht selbst deformieren. Aus diesem Grund wird er aus Diamant hergestellt. Am gebräuchlichsten sind die quadratische Pyramide nach *Vickers*, die rhombische nach *Knoop* und der meißelförmig geschliffene Eindringkörper nach *Attinger*. Ihre wichtigsten Daten sind in Tafel 6.10. zusammengestellt.

Bei der Härte nach *Vickers* wird aus den Längen der beiden gemessenen Diagonalen der annähernd quadratischen Grundfläche das arithmetische Mittel d gebildet und in die Gleichung

$$HV = 0{,}189 \frac{F}{d^2} \tag{6.53}$$

eingesetzt, wobei die Prüfkraft F in N und das Mittel der Diagonalen d in mm gemessen werden.

Tafel 6.10. Härteprüfverfahren

Verfahren	Vickers	Knoop	Attinger
Eindringkörper Diamant	quadratische Pyramide, Flächenwinkel 136°	rhombische Pyramide, großer Kantenwinkel 172° 30′ kleiner Kantenwinkel 130°	gleichschenkliges, dreiseitiges Prisma, Schneidenwinkel 100°
Gestalt des Eindrucks	d	l	l
Eindringtiefe	$\sim d/7$	$\sim l/30$	$\sim l/4$
Härte F(N) d, l mm	$HV = 0{,}189 F/d^2$	$HK = 1{,}4515 F/l^2$	$HA = 0{,}787 F/l^2$

Dagegen wird bei der Härte nach *Knoop* nur die lange Diagonale l der rhombischen Grundfläche in mm ausgemessen und in die Gleichung

$$HK = 1{,}4515 \frac{F}{l^2} \tag{6.54}$$

eingesetzt. Zwischen den beiden Härten besteht kein linearer Zusammenhang, da bei der nach *Vickers* die Oberfläche des Eindrucks und bei der nach *Knoop* seine Projektionsfläche in die entsprechende Gleichung eingeht.

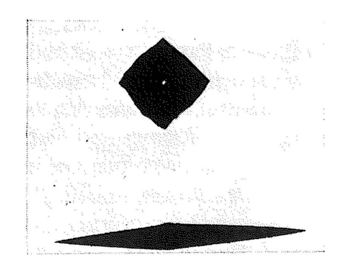


Bild 6.212 Vergleich der Eindruckformen nach Vickers und nach Knoop bei gleicher Prüfkraft

Vergleicht man einen Eindruck nach *Vickers* mit einem solchen nach *Knoop* bei gleicher Prüfkraft (Bild 6.212), so ergibt sich, daß die Diagonale des rhombischen Eindrucks fast dreimal so lang wie die des quadratischen Eindrucks ist. Da die Eindringtiefe bei *Vickers* 1/7 d, bei *Knoop* dagegen 1/30 l beträgt, ist sie bei *Knoop* nur $\frac{2}{3}$ von der bei *Vickers*. Aus diesem Grund ist es vorteilhafter, bei harten und spröden Werkstoffen, wie Glas, Karbide oder Oxide, oder bei dünnen Folien und Schichten die Härte nach *Knoop* zu bestimmen. Dabei ist zu beachten, daß die Eindringtiefe höchstens $\frac{1}{10}$ der zu untersuchenden Schichtdicke betragen darf. Nach *Semlitsch* und *Bergsman* [496] soll erfahrungsgemäß die Eindringtiefe bei weichgeglühten Metallen, die Kaltverfestigungseigenschaften aufweisen, geringer als $\frac{1}{20}$ bis $\frac{1}{30}$ der Probendicke sein.

Die Eindringkörper nach *Vickers* und *Knoop* eignen sich nicht zur Bestimmung der Härte von zylindrischen Teilen von weniger als Dmr. 1 mm. Um ein Anschleifen einer ebenen Prüffläche zu vermeiden, wird hierbei nach dem Vorschlag von *Attinger* [489] ein meißelförmiger Eindringkörper rechtwinklig zur Zylinderachse eingedrückt. Es wird nun die Prüfkraft ermittelt, bei der die Länge des bootförmigen Eindrucks $\frac{1}{4}$ des Zylinderdurchmessers beträgt. Nach *Kaufmann* [493] kann man mit einem meißelförmigen Eindringkörper auch die Mikroeindruckhärte an zylindrischen Fasern und Elementarfäden bestimmen.

Schließlich sei darauf hingewiesen, daß die Ablesegenauigkeit der langen Diagonalen l bei *Knoop* wegen der recht spitz zulaufenden Seitenspuren geringer als die der Diagonalen d bei *Vickers* ist. Infolge des begrenzten Auflösungsvermögens des Mikroskops werden die Diagonallängen grundsätzlich zu kurz gemessen. Dieser Fehler läßt sich durch die Beziehung

$$d = 1{,}22\,\varkappa \frac{\lambda \cot \alpha/2}{A}$$

ausdrücken [495], wobei α der Eckenwinkel des Eindrucks ist. Wenn man von Deformationen des Eindrucks absieht, sind für α bei *Vickers* 90° und bei *Knoop* 16° einzusetzen. Der Faktor $\varkappa$ hängt sowohl vom Beobachter als auch von den Kontrastverhältnissen und dem Beleuchtungsverfahren ab. Setzt man für ihn den Wert 0,4 ein, so erhält man für $\lambda = 500$ nm praktisch die in [494] angeführten Werte für die Verkürzung der Diagonalen. Da der Wert 0,4 für $\varkappa$ u. U. zu klein sein dürfte, ist in der Darstellung (Bild 6.213) der Bereich von 0,4 bis 0,5 angegeben worden. Die Verkürzung hängt damit noch von der numerischen Apertur des zur Ausmessung benutzten Objektivs, die nie unter 0,3 betragen soll, und von der Form des Eindringkörpers ab. Aus der Darstellung ist eindeutig zu entnehmen, daß bei der Härte nach *Knoop* die Diagonalenverkürzung etwa 7mal größer als bei der nach *Vickers* ist. Ferner soll man zum Ausmessen der Eindrücke ein Objektiv möglichst hoher numerischer Apertur benutzen.

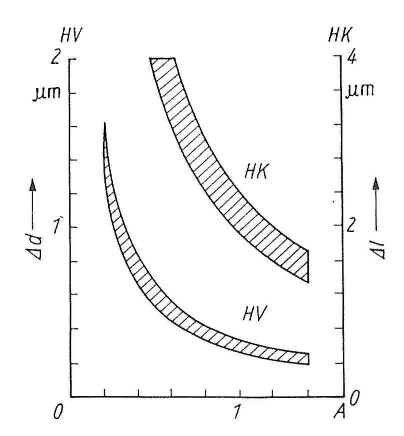


Bild 6.213. Verkürzung der Diagonalen infolge des begrenzten Auflösungsvermögens der Objektive

Es gibt noch einen anderen augenfälligen Unterschied zwischen den beiden Arten der Härtebestimmung. Man kann mit beiden Methoden die Richtungsabhängigkeit der Mikroeindruckhärte feststellen. Die damit verbundene Verzerrung ist am Vickers-Eindruck (Bild 6.214) ohne weiteres zu erkennen, während sie beim einzelnen Knoop-Eindruck kaum merkbar ist. Hier bedarf es mindestens zweier, manchmal sogar mehrerer Eindrücke unterschiedlicher Richtung bei gleicher Prüfkraft, um eine Anisotropie feststellen zu können.

Wie man im Bild sieht, kann bei diesem Material, wie hier am Zinkeinkristall, die Mikroeindruckhärte in ihrer Richtungsabhängigkeit nur nach *Knoop* bestimmt werden; denn würde man die beiden Diagonalen des verzerrten Vickers-Eindrucks als Grundlage für die Bestimmung der Härtewerte wählen, so würde man gerade zu dem umgekehrten Ergebnis wie bei *Knoop* gelangen.

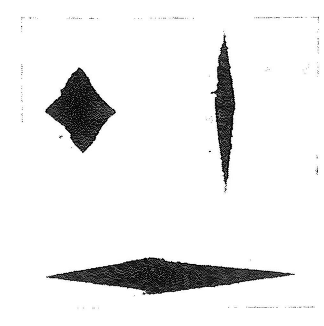


Bild 6.214 Richtungsabhängigkeit der Mikroeindruckhärte bei Zink

Die Ursache für das gezeigte auffällige Verhalten ist die ausgeprägte Richtungsabhängigkeit einiger Eigenschaften des Zinks, die mit seinem hexagonalen Gitter zusammenhängen. Hier spielt zweifellos die starke Richtungsabhängigkeit des Elastizitätsmoduls die entscheidende Rolle. Nach *Eisenkolb* [492] schwankt der Elastizitätsmodul zwischen den Werten 35,3 und 123,6 GPa.

Nach *Tertsch* [497] ist zu beachten, daß beim Vorliegen einer Richtungsabhängigkeit der Härte benachbarte, gleichorientierte Eindrücke, unabhängig von der Prüfkraft, einander ähnlich sein müssen. Von diesen gesetzmäßigen Verzerrungen sind die zufälligen zu unterscheiden, die durch Fehlbaustellen des Materials oder durch darunterliegende andere Gefügebestandteile verursacht werden.

Nach Möglichkeit ist die Bestimmung der Mikroeindruckhärte an einem Einzelkorn durchzuführen. Um eine Beeinflussung der Eindrücke zu vermeiden, soll der Abstand eines Eindruckmittelpunkts vom Mittelpunkt des benachbarten Eindrucks mindestens doppelt so groß wie die anfallende Eindruckdiagonale sein. Denselben Abstand hält man auch von den Korngrenzen und der Probenkante ein.

Ist dies wegen der Kleinheit der Körner nicht möglich, so verwendet man zur Messung möglichst annähernd gleich große und gleich orientierte Körner. Dabei ist aber auf eine auftretende Härteanisotropie zu achten. Auf gleich orientierte Körner ist Wert zu legen, damit man die gesetzmäßigen Verzerrungen von den rein zufälligen trennen

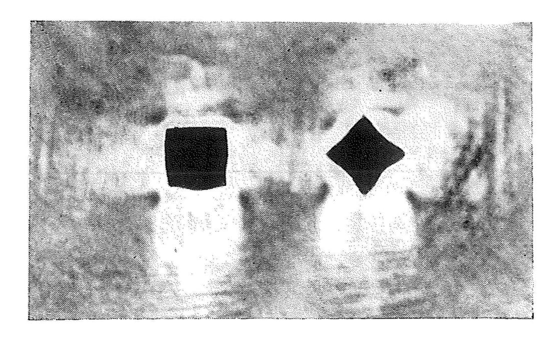


Bild 6.215. Charakteristische Formen von Vickers-Eindrücken

rechts: Diagonale; links: Quadratseite parallel zu den Gleitlinien

kann. Wie im Bild 6.215 eindeutig gezeigt wird, hängen die in der Praxis vorkommenden Abweichungen der Eindrücke vom Quadrat, sei es nach der konkaven oder der konvexen Form, von der Kristallorientierung in der Probe ab. Es kommt nur auf die Stellung des Eindringkörpers zu den Gleitlinien des Materials an.

Man kann nach *Tertsch* [497] entweder die absolute, die echte, oder die relative Mikroeindruckhärte bestimmen. Im ersten Fall werden nicht nur unmittelbar auswertbare Härtewerte, sondern auch ihre Abhängigkeit von der Prüfkraft ermittelt. Im zweiten dagegen beschränkt man sich auf das Messen der Härte bei einer vorher festgelegten Prüfkraft. Diese Einschränkung verkürzt den Meßvorgang und die Auswertung ganz wesentlich. Es genügt z. B. zur Ermittlung des Einflusses einer mechanischen oder thermischen Behandlung, wenn man vor und nach der Behandlung die relative Mikroeindruckhärte ermittelt.

Von der Härtebestimmung mit Prüfkräften über 98,1 N ist man gewöhnt, daß sich bei Eindringkörpern in Pyramidenform, unabhängig von der Eindringtiefe und damit von der Prüfkraft, geometrisch ähnliche Eindrücke ergeben. Hier gilt also der Ähnlichkeitssatz, den *Kick* aufgestellt hat,

$$F = a_1 d^2,$$

wobei die Konstante a_1 von dem zu untersuchenden Material und von der Form des Eindringkörpers abhängt. Damit wird die Härte von der Prüfkraft unabhängig. Doch gilt dieser Satz nicht für den gesamten Bereich der in der Technik verwendeten Prüfkräfte. Bei kleinen Prüfkräften, wie sie in der Mikroeindruckhärte üblich sind, kann man den Kickschen Satz nur als eine erste, sehr grobe Näherung bezeichnen.

Eine praktisch recht gute Näherung stellt die Beziehung

$$F = a_2 d^n$$

dar, die von *Hanemann* [490] in die Härteprüfung eingeführt worden ist. Da eine formgleiche Beziehung von *Meyer* für die Brinellhärte aufgestellt worden war, ist es unkorrekterweise üblich geworden, obige Beziehung als Meyersches Potenzgesetz zu bezeichnen. Daß es sich hierbei auch nur um eine Näherung handelt, beweist die Tatsache, daß bei hinreichend großen Prüfkraftbereichen der Exponent n nicht konstant bleibt.

In der Praxis wird das Potenzgesetz logarithmiert, so daß es die Gestalt

$$\lg F = \lg a_2 + n \lg d$$

erhält. Dies stellt, wenn man $\lg d$ als Abszisse und $\lg F$ als Ordinate aufträgt, in den Prüfkraftbereichen, in denen n als konstant angesehen werden kann, eine Gerade mit der Steigung n dar (Bild 6.216, links).

Setzt man das Potenzgesetz in die Gleichung für die Mikroeindruckhärte ein, so erhält man

$$\mathrm{HV} = c d^{n-2}$$

und logarithmiert

$$\lg \mathrm{HV} = \lg c + (n - 2) \lg d.$$

Wie man im Bild 6.216, rechts, sofort sieht, ist die Härte nur für den Fall $n = 2$ von der Prüfkraft unabhängig; mit $n < 2$, ein Fall, der sehr häufig eintritt, nimmt sie mit größer werdender Diagonalen, damit mit größer werdender Prüfkraft ab und für $n > 2$ zu.

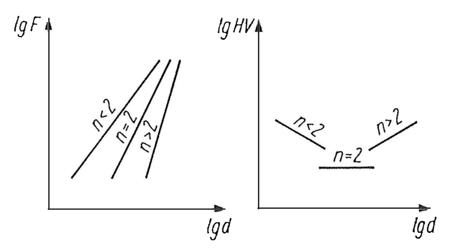


Bild 6.216. Meyer- und Härtegerade

Im allgemeinen stellt aber das logarithmierte Potenzgesetz eine Kurve dar. Nach *Bückle* [490] [491] lassen sich alle experimentell bestimmten $\lg F/\lg d$-Kurven auf zwei Grundformen (Bild 6.217) zurückführen. Für einphasige homogene Legierungen mit ungestörtem Gitter erhält man

die Form a), während sich für Legierungen mit heterogenem Gefüge oder mit gestörtem Gitter die Form b) ergibt. Zu letzteren gehören Ausscheidungen, Feinkorn, Seigerungen und Spannungsfelder.
Aus dem Gesagten ist zu entnehmen, daß man bei der Bestimmung der Mikrohärte weder aus der ermittelten Mikrohärte auf die Makrohärte schließen noch über den gewählten Prüfkraftbereich hinaus extrapolieren kann, wenn der Verlauf der lg F/lg d-Kurve nicht bekannt ist.

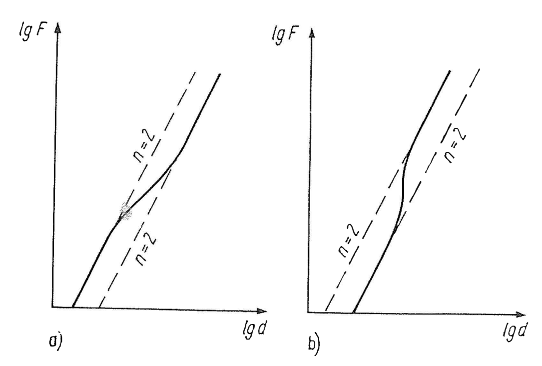


Bild 6.217. Grundformen der lg F/lg d-Kurven

Wegen der Prüfkraftabhängigkeit der Mikroeindruckhärte ist es schließlich notwendig, bei einem ermittelten Härtewert genau anzugeben, mit welcher Prüfkraft bzw. bei welcher Diagonalenlänge er bestimmt worden ist. Dabei wird die Prüfkraft in 0,1 N angehängt, die Diagonallänge als Index angefügt. So bedeutet z.B. HV 0,01 die Mikrohärte nach *Vickers* bei $F = 0,1$ N und HK 5 µm die nach *Knoop* bei $l = 5$ µm. Für die Angabe der absoluten Mikrohärte genügen entweder drei verschiedene Härtewerte oder einer und der Exponent n. Dabei werden die folgenden Werte vorgezogen: HV 0,025; HV 0,05 und HV 0,1 oder nach *Onitsch* "HV 10 µm.
Zum Bestimmen der absoluten Mikrohärte ist es notwendig, mit mindestens drei, besser mit fünf Prüfkraftwerten zu arbeiten, um entscheiden zu können, ob in dem gewählten Prüfkraftbereich die lg F/lg d-Kurve durch eine Gerade ersetzt werden kann. Mit jeder Prüfkraft sind bei der Knoophärte mindestens fünf, bei der Vickershärte drei Eindrücke (= sechs Meßwerte) auszuführen. Bei starker Streuung ist die Anzahl der Eindrücke zu erhöhen.
Die zusammengehörigen Werte von F und d werden auf doppeltlogarithmisches Papier (Bild 6.218)

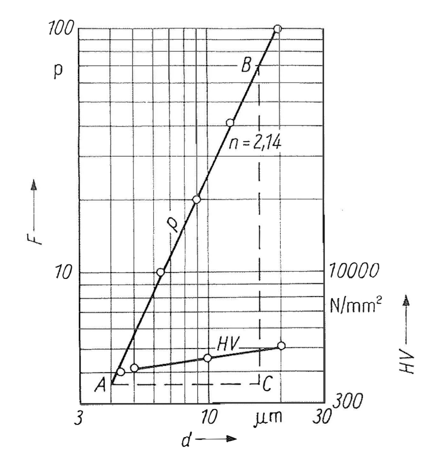


Bild 6.218. Auswertung einer Meßreihe mit Hilfe der Meyer- und Härtegeraden

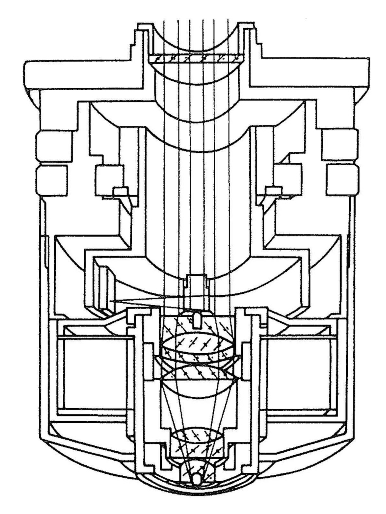


Bild 6.219. Mikrohärteprüfeinrichtung mhp 100
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

aufgetragen. Dabei kann man sofort entscheiden, ob sich die Meßwerte durch geschicktes Einzeichnen einer Geraden ausgleichen lassen. Wenn dies nicht möglich ist, muß der Prüfkraftbereich eingeengt werden. In dasselbe Rechenblatt läßt sich auch noch die Härtegerade einzeichnen, und aus ihm können die Werte für z.B. HV 5 µm, HV 10 µm und HV 20 µm und schließlich der Exponent $n = BC/AC$ entnommen werden.
Die erste Mikrohärteprüfeinrichtung nach Angaben von *Hanemann* wurde im Jahre 1940 von den Zeiss-Werken in Jena herausgebracht. Bei dieser Einrichtung (im Bild 6.219 wird sie im Schnitt

gezeigt) wird die Diamantpyramide nach *Vickers* in die Mitte der Frontlinse des federnd aufgehängten Objektivs eingesetzt. Damit wird eine nicht zu überbietende Treffsicherheit erreicht. Die Prüfkraft wird durch die elastische Auslagerung des Objektivs erzielt und optisch ausgemessen. Da die

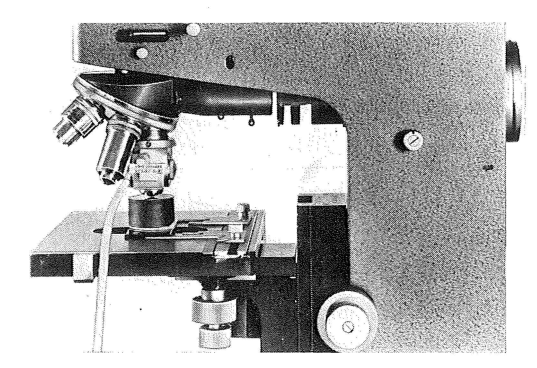


Bild 6.220. Automatischer Mikro-Härteprüfer
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

Diamantpyramide die Objektivapertur beschneidet, ist ein Bildgüteverlust unvermeidbar. Kann die Treffsicherheit $\pm$ 2 µm und mehr betragen, so trennt man Eindringkörper und Objektiv. Im Bild 6.220 ist ein Druckkörper dargestellt, der eine Diamantaufnahme für einen Vickers- oder Knoopdiamanten und ein um 90° versetztes Einstellobjektiv enthält. Der Druck des auf einen Druckregler aufgelegten Massestücks wird durch Druckluft auf den Druckkörper übertragen. Dieser ist anstelle eines normalen Objektivs in den Objektivrevolver einschraubbar. Man kann somit zu jeder Zeit entweder den Eindringkörper oder das Objektiv in die optische Achse des Mikroskops bringen.
Zum Schluß sei noch auf einige Punkte hingewiesen, deren Nichtbeachtung in der Praxis leicht zu Fehlern bei der Bestimmung der Mikrohärte führt. Zunächst spielt die exakte Ermittlung der Prüfkraft eine entscheidende Rolle. Bei Geräten, wie die Einrichtung mhp 100, ist die Eichkurve für die Prüfkraft vorher zu ermitteln und von Zeit zu Zeit zu kontrollieren. Die Überprüfung des Diamantdrucks beim Härteprüfer (Bild 6.220) wird mit Hilfe einer Eichwaage durchgeführt. Nach *Mott* [494] bzw. *Semlitsch* und *Bergsmann* [496] ist ein konstantes Prüfkraftfehler eines Geräts an weichem Stahl, Kupfer oder weichgeglühtem Aluminium leicht festzustellen, indem man bei verschiedenen Prüfkraftstufen die Eindruckdiagonalen ermittelt und die Ergebnisse in ein F/d^2-Diagramm einträgt.
Da auch das Aufsetzen des Eindringkörpers auf die Probe und die Geschwindigkeit, mit der der gewünschte Höchstwert der Prüfkraft erreicht wird, von Einfluß auf die Härtemessung sind, soll das Aufbringen der Prüfkraft möglichst langsam und kontinuierlich erfolgen. Am besten benutzt man hierzu den Feintrieb, wenn dieser Vorgang nicht automatisch, sondern manuell vorgenommen wird. Ferner ist währendeiner Mikrohärtemessung die Dauer, während der der Höchstwert der Prüfkraft auf die Probe einwirkt, konstant zu halten. Je nach dem zu untersuchenden Material wird eine Krafthaltedauer zwischen 5 und 30 s für ausreichend gehalten. Ferner muß das Auftreten von Schwingungen und Erschütterungen während des Eindruckvorgangs unbedingt vermieden werden, denn sonst erhält man zu große Eindrücke.
Der Probenvorbereitung muß auch die nötige Sorgfalt gewidmet werden. Eine Oberflächenverfestigung durch den Schleif- und Polierprozeß kann sehr leicht den Meßwert verfälschen. Verfestigte Oberflächenschichten bis 0,1 mm Tiefe kann man mühelos durch elektrolytisches Polieren abtragen.

6.2.7. Hinweise zur Präparation metallischer Proben und Erze

von Dr.-Ing. *Reinhard Bernst*

Sowohl die Leistungsfähigkeit eines Metallmikroskops als auch die Aussagekraft einer metallografischen Untersuchung können nur bei einwandfrei präparierten Proben voll ausgeschöpft werden. Der sachgemäßen Präparation der Proben kommt somit größte Bedeutung zu, so daß auch hier ein Hinweis auf die Grundlagen der Präparationstechnik notwendig ist.
Entsprechend der in der metallografischen Praxis dominierenden Untersuchung im Auflicht beschränkt sich der Inhalt dieses Abschnitts nur auf die Beschreibung der Herstellung von Anschliffen, die in der Metallografie kurz als Schliffe bezeichnet werden.
Der Vollständigkeit halber sei aber auch darauf hingewiesen, daß die lichtmikroskopische Untersuchung von Plastwerkstoffen – Plastografie genannt – zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ihr Ziel ist es, bei bekannter chemischer Zusammensetzung der Plaste aus dem Gesamtbild der makro- und mikroskopisch sichtbaren Gefügestrukturen heraus Aussagen über die Qualität, die

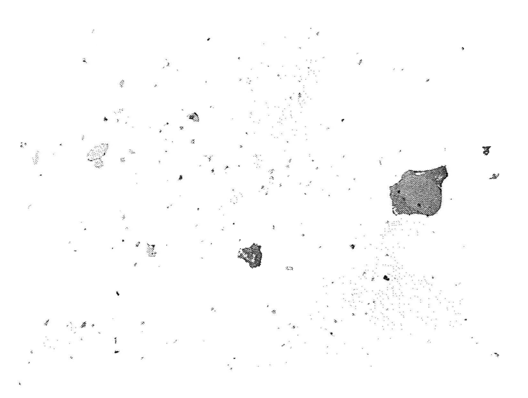
Eigenschaften und die Verarbeitbarkeit zu gewinnen.
Sieht man von der Untersuchung von Bruchflächen ab, so ist jede metallografische Untersuchung mit einer recht aufwendigen Probenvorbereitung verbunden. Der Aufwand wächst mit steigender Schliffgüte und sollte deshalb nicht weiter getrieben werden, als es der jeweilige Untersuchungszweck erfordert. Die Präparationstechnik hat einen Stand erreicht, der für die einzelnen Werkstoffe und Untersuchungszwecke jeweils geeignete Verfahren anbietet. Dazu zählen auch die Herstellung von Pulverpräparaten [500], die Präparation bestrahlter Materialien in sog. „heißen Zellen" [519] und die zerstörungsfreie metallografische Untersuchung großer Bauteile [506] ohne Probennahme und ggf. auch ohne direkte mikroskopische Betrachtung unter Zuhilfenahme von Folienabdrücken.
Nicht nur das Untersuchungsergebnis hängt von der Wahl der Verfahrensvariante ab, sondern auch der Aufwand, auf dessen Senkung die Entwicklung besonders gerichtet ist. In diesem Rahmen ist es nicht möglich, alle Verfahren darzustellen und Arbeitsvorschriften für die einzelnen Werkstoffe zu geben. Die Ausführungen beschränken sich auf einen kurzen Überblick über die wesentlichen Präparationsmöglichkeiten und einige globale Hinweise zur Einsatzmöglichkeit der Verfahren.

6.2.7.1. Probennahme

Die zielgerichtete Schliffvorbereitung setzt bereits bei der Probennahme ein. Die Probe muß repräsentativ für die Gesamtheit des zu untersuchenden Materials sein bzw. bei gezielter Präparation das interessierende Detail in von der Probennahme unbeeinflußtem Zustand enthalten. Der Zweck der Untersuchung bestimmt, von welcher Stelle des Prüflings die Probe entnommen werden muß und in welcher Lage die Schlifffläche vorzusehen ist.
Bei verformten Halbzeugen und Werkstücken ist grundsätzlich zwischen Längs- und Querschliffen, bezogen auf die Hauptverformungsrichtung, (Bild 6.221) und bei gegossenen Werkstoffen mit transkristalliner Erstarrung (Stengelkristalle) zwischen Schliffen parallel und senkrecht zur Oberfläche zu unterscheiden. Bei Gußwerkstoffen ist weiterhin die Wanddickenabhängigkeit des Gefüges zu beachten, die auf unterschiedliche Abkühlungsgeschwindigkeiten zurückzuführen ist. Deshalb sind meist auch beträchtliche Gefügeunterschiede zwischen oberflächennahen Bereichen



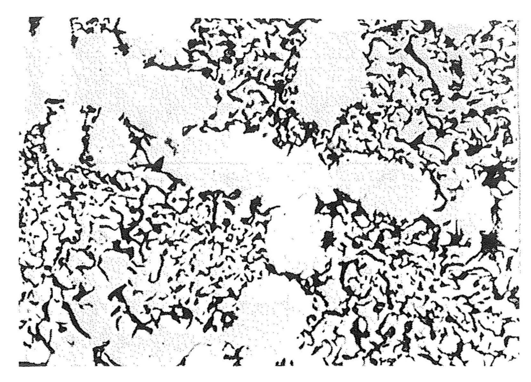
a) Längsschliff in Walzrichtung



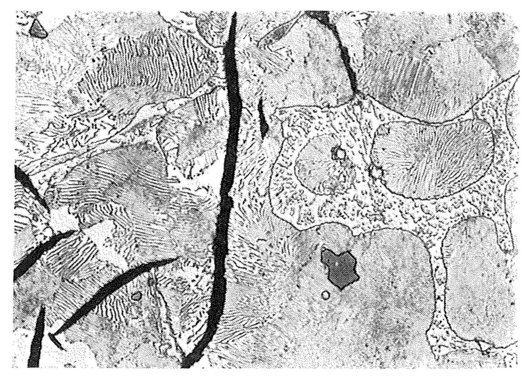
b) Querschliff quer zur Walzrichtung

Bild 6.221. Große Sulfide im Automatenstahl 9S20, poliert
M 100:1

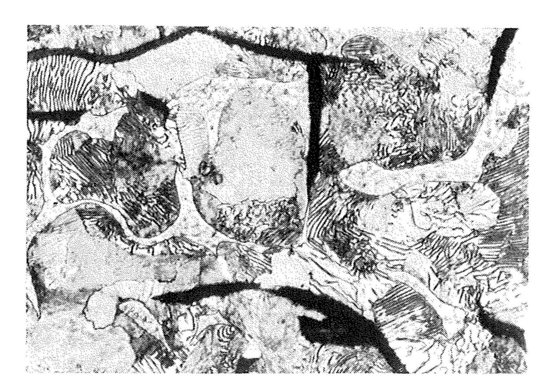
und dem Werkstückinnern zu beobachten (Bild 6.222). Oberflächenbehandelte Teile werden bevorzugt senkrecht zur Oberfläche untersucht (Bild 6.223 a); nur selten liegt die Schlifffläche parallel zur Oberfläche. Sind die zu untersuchenden Schichten sehr dünn, so ist oft ein Schrägschliff unter einem kleinen Winkel zur Oberfläche (Bild 6.223 b) zu empfehlen, so daß sich die angeschnittene Schicht dabei vergrößert [509].
Jeder Arbeitsgang der Schliffvorbereitung ist dem Grundsatz unterzuordnen, das vorliegende Gefüge durch die Präparation nur so gering wie möglich zu beeinflussen und Gefügeänderungen zu vermeiden. Die größten Gefahren drohen dem vorliegenden Gefüge durch übermäßige Erwärmung und Verformung. Jeder bei Raumtemperatur instabile Gefügezustand hat bei Erwärmung das Bestreben, in den thermodynamisch stabilen überzugehen.



a) Rand



b) Kern



c) Kern, unsachgemäß zu lange poliert

Bild 6.222. Strangguß GGL-25, 60 mm Dmr., geätzt mit 7%iger HNO_3
M 500 : 1

Eine solche Gefügeänderung kann z.B. leicht bei gehärtetem, nicht angelassenem Stahl eintreten. Die Gefahr der plastischen Verformung besteht besonders bei sehr weichen Metallen und ist mit Rekristallisationserscheinungen verbunden. Deshalb sollte eine plastische Verformung der Proben, z.B. durch das Einspannen sehr weicher Proben in einen Schraubstock, vermieden werden und die Abspanung nur vorsichtig mit scharfen Werkzeugen und relativ geringem Vorschub und geringer Spantiefe erfolgen. Auf ausreichende Kühlung ist zu achten. Besonders vorsichtig und unter intensiver Kühlung muß das evtl. Zurichten der Proben an Schleifkörpern (Korund) vorgenommen werden.

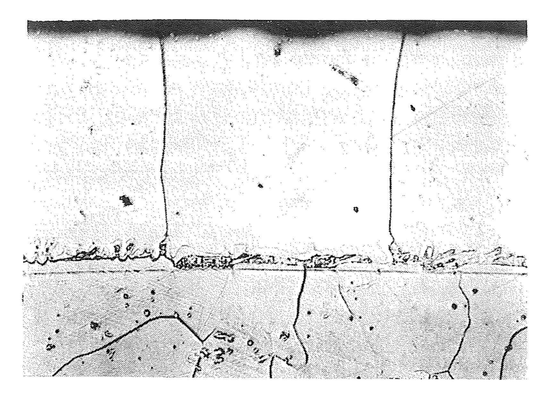
Sehr unzweckmäßig, manchmal aber nicht zu umgehen, ist das Ausschneiden der Proben mit dem Schweißbrenner. In diesen Fällen ist es unbedingt erforderlich, die gesamte wärmebeeinflußte Zone abzuarbeiten, um das ursprüngliche Gefüge untersuchen zu können.

Für das Heraustrennen von Proben aus sehr harten Werkstoffen, wie Hartmetall, gehärteter Stahl, ledeburitisches Gußeisen, Keramik und Mineralien, eignet sich nur das Trennschleifen (Bild 6.224), das sehr sorgfältig bei ausreichender Kühlung, oft mit Maschinen, bei denen das Schneiden sogar vollkommen unter Wasser geschieht, durchzuführen ist. Dieses Verfahren wird in zunehmendem Maße aber auch für das Trennen weicher Werkstoffe eingesetzt, vermeidet es doch übermäßige Kaltverformung und bei einwandfreier Kühlung eine Erwärmung der Schnittfläche. Außerdem ist die gewonnene Oberfläche glatt und erlaubt somit u. U., ohne nachfolgendes Schleifen sofort zum elektrolytischen Polieren überzugehen.

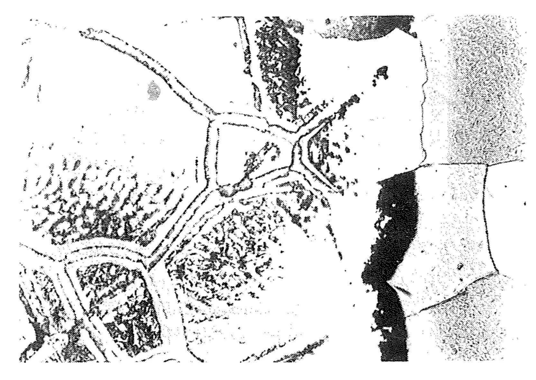
Je nach zu trennendem Werkstoff werden Aluminiumoxid-, Siliziumkarbid- und Diamanttrennschleifkörper mit verschiedenen Bindungen angeboten. Eine allgemeingültige Regel besagt, daß „harte" Trennscheiben zum Schleifen von weichen und „weiche" Trennscheiben zum Schneiden von härteren Werkstoffen zu verwenden sind. Die Bezeichnung *hart* und *weich* kennzeichnet die Verschleißfestigkeit des Bindemittels, d.h., ob die Schneidemittelkörner leicht oder schwer aus dem Bindemittel ausbrechen. Grundsätzlich ist auf eine einwandfreie Montage des Trennschleifkörpers, sicheres Spannen der Probe, genügende und gleichmäßige Kühlung sowie auf ausreichenden Druck auf den Trennschleifkörper, damit sich das Bindemittel abnutzt und immer wieder neue Schneidmittelkörner an der Oberfläche freilegt, zu achten.

Für spezielle Probennahmen, besonders für spröde Werkstoffe, kommen auch das Fadentrennen, Pulverstrahlen und Trennen mit dem Ultraschallmeißel in Betracht.

Das elektroerosive und elektrochemische Trennen



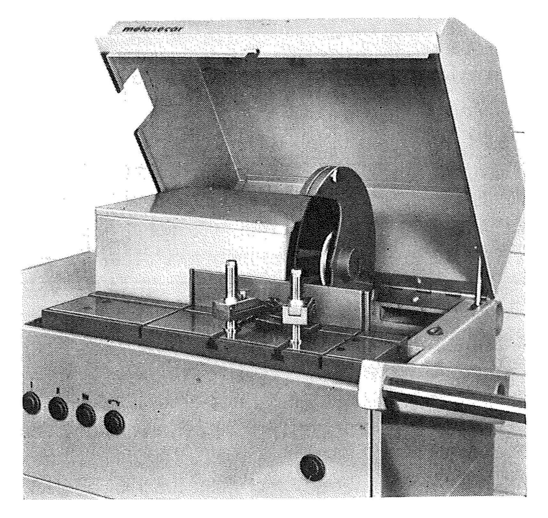
a) Schliffebene senkrecht zur Oberfläche, parallel zur Diffusionsrichtung, ionengeätzt, M 200 : 1



b) eutektoide Zwischenschicht, Schrägschliff, elektrolytisch geätzt; M 500 : 1

Bild 6.223. Cr-Diffusionsschicht mit eutektoider Zwischenschicht auf St TZb, elektrolytisch poliert

Bild 6.224. Trennschleifgerät metasecar
VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow, Werkfoto



haben in der Metallografie (in Anbetracht der langen Trennzeiten) bisher kaum Eingang gefunden.
Auf eine einwandfreie Kennzeichnung der Proben sei hingewiesen. Dabei sollten aber Schlagzahlen oder -buchstaben nur dort angebracht werden, wo eine Beeinflussung des Gefüges der Schliffläche durch plastische Verformung nicht zu befürchten ist.

6.2.7.2. Einfassen und Einbetten der Proben

Um den Arbeitsaufwand, besonders die Polierzeit nicht unnötig zu erhöhen, ist die Schliffgröße auf 1 bis 2 cm^2 zu begrenzen, soweit nicht größere Flächen zur Untersuchung herangezogen werden müssen. Bei sehr großen Flächen empfiehlt sich eine Aufteilung des Objekts in mehrere getrennte Schliffe. Grundsätzlich soll die Höhe der Proben kleiner sein als die Länge oder Breite, sonst neigen sie bei der Bearbeitung leicht zum Kippen und damit zu unebenen Schliffflächen. Weiterhin ist es ratsam, die Kanten des Schliffs zu brechen, um einer Verletzungsgefahr und der Beschädigung der Schleifpapiere und Poliertücher vorzubeugen.
In vielen Fällen konzentriert sich die Untersuchung auf das Gefüge der Randzone bzw. auf einen Vergleich zwischen Rand- und Kerngefüge, wozu Proben mit einwandfrei präparierten, nicht ausgebrochenen Randzonen ohne Randabfall erforderlich sind. Für diese Untersuchungen müssen die Proben in Probenhalter – auch Schliffklammern genannt – gefaßt oder eingebettet werden. Das Einfassen oder -betten der Proben ist aber auch sehr oft für kleine, unregelmäßig geformte unhandliche oder feine zerbrechliche Proben und im Sinne einer Rationalisierung der Schliffvorbereitung, indem gleichzeitig mehrere kleine Proben (gleichen Werkstoffs) gefaßt und bearbeitet werden, unumgänglich.
In den einzelnen Laboratorien sind eine Vielzahl unterschiedlich gestalteter Schliffklammern oder Einspannvorrichtungen im Gebrauch, die der jeweiligen Probenform und dem Untersuchungszweck angepaßt sind.
Im Bild 6.225 wird eine Auswahl der bekanntesten Formen gezeigt. Es ist zu empfehlen, zwischen Probe und Schliffklammer eine Zwischenlage (z. B. eine dünne weiche Kupferfolie) zu spannen, die, jede Unebenheit und auch den feinsten Spalt ausfüllend, äußerst randscharfe Schliffe ohne die geringsten Randausbröckelungen herzustellen gestattet. Ist die Härtedifferenz zwischen Probe

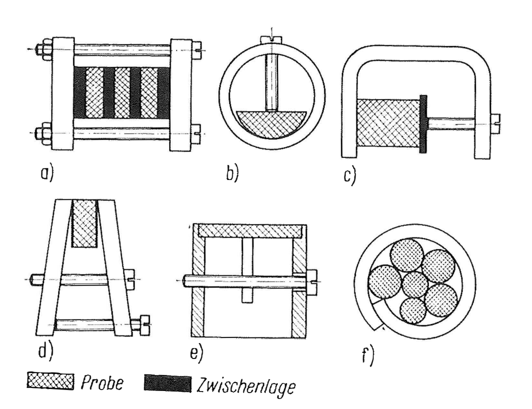


Bild 6.225. Gebräuchliche Formen von Schliffhaltern

(z.B. nitrierter Stahl) und Schliffklammer sehr groß, können zur Erzielung äußerst randscharfer Schliffe zwischen Probe und Probenhalter Rasierklingen gespannt werden. Für höchste Anforderungen hat sich besonders die Schliffklammerform *d* bewährt. Die Ausführung *e* ist z.B. eine Spezialform zur Präparation relativ dünner scheibenförmiger Objekte, wie sie von der Emissionselektronenmikroskopie gefordert werden. Die Schliffklammer sollte in der Regel aus dem gleichen Material gefertigt sein wie die zu untersuchende Probe, zumindest Stahl für Eisenwerkstoffe, Kupfer oder Messing für Kupferwerkstoffe und eine Aluminiumlegierung für Aluminiumwerkstoffe.

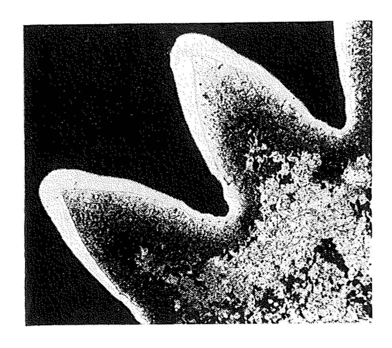


Bild 6.226. Randscharfer Schliff durch eine galvanische Zwischenschicht (Cr) bei einer im Epoxidharz eingebetteten Probe
M 100:1

Zum Einbetten dienten früher niedrigschmelzende Metalle und Legierungen, z.B. Pb (327°C), Wood-Metall (Bi–Pb–Sn–Cd-Leg., 50/25/12,5/12,5 Masse-%, 65°C) und Libowitz-Metall (Bi–Pb–Sn–Cd-Leg., 50/27/13/10 Masse-%, 70°C), Siegellack, Schwefel, Gips u.a., die fast ausschließlich durch Plaste und Kunstharze ersetzt wurden. Diese haben den Vorteil, sich gegen die meisten Ätzmittel neutral zu verhalten, die Probe eng zu umschließen, wodurch das Eindringen von Ätzlösungen in Poren und Fugen vermieden wird, und z.T. durchsichtig zu sein, so daß man bestimmte Probenstellen beim Anschleifen genau beobachten kann.

Es sind eine Vielzahl von Einbettmassen auf dem Markt: glasklare sowie undurchsichtige kaltaushärtende Gieß- (z.B. Epoxidharze) und warmaushärtende (z.B. Phenol- und Alkydharze, teils mit Holzmehl, Asbest, Glaswolle oder ähnlichem gemischt) sowie thermoplastische (z.B. Polyäthylen, Polymethylmetacrylate) Preßmassen.

Eine andere Methode zur Untersuchung der äußersten Randzone ist der Schutz derselben durch einen relativ dicken galvanischen Überzug (Cu, Ni, Cr). Für hohe Anforderungen ist eine Kombination von galvanischem Überzug und mechanischem Einfassen oder Einbetten zu empfehlen (Bild 6.226).

6.2.7.3. Schleifen

Für die mikroskopische Gefügeuntersuchung ist eine ebene glatte, saubere Schlifffläche erforderlich, die durch Schleifen und Polieren erhalten wird. Ziel des Schleifens ist, eine plane Oberfläche mit einer so geringen Rauhigkeit zu schaffen, daß durch anschließendes Polieren unter vertretbarem Aufwand der Endzustand der Schlifffläche (abgesehen vom Ätzen) erreicht wird. Dieser Arbeitsgang sollte sehr sorgfältig ausgeführt werden, denn beim nachträglichen Polieren muß ein Vielfaches der beim Schleifen scheinbar eingesparten Zeit zusätzlich aufgewendet werden.

In der Metallografie dominiert heute noch eindeutig das mechanische Schleifen, das in verschiedenen Varianten durchgeführt wird. Das elektroerosive und elektrolytische oder anodische Schleifen (Elysieren) werden bisher kaum angewendet, obwohl elektrolytisches dem normalen Naßschleifen aufgrund der wesentlich geringer verformten und dünneren Verformschicht, die kürzere Polierzeiten erlaubt, überlegen ist [532].

Als Schleifmittel für das mechanische Schleifen dienen bevorzugt Siliziumkarbid, Korund, Diamant, Schmirgel und Borkarbid in verschieden abgestuften Körnungen. Die groben Körnungen, z.B. die Korngruppen 20, 12, 8, 6, 5, werden durch Sieben, die feineren, z.B. die Korngrößen-Nr. F 40, F 28, F 20, F 14, durch Schlämmen

oder Windsichten erhalten. Die Korngröße der Schleifmittel fällt jeweils in der genannten Reihenfolge.
Die Schleifmittel kommen als Schleifkörper, Papiere oder Gewebe, bevorzugt in Form von Ronden und Bändern, und seltener als Emulsionen, Aufschlämmungen, Pasten und losen Pulvern zur Anwendung.
Grundsätzlich wird beim Schleifen bei der gröbsten Körnung begonnen, und man geht dann zu einer immer feineren Körnung über. Nach jedem Körnungswechsel wird der Schliff sorgfältig von anhaftenden Schleifmittelresten gesäubert, um 90° gedreht und wieder so lange geschliffen, bis die Schleifriefen von der vorangegangenen Körnung verschwunden sind. Oft wird zwischen Grob- und Feinschleifen unterschieden. Ersteres zählt etwa bis zur Korngruppe 8. Bei welcher Körnung begonnen werden muß, ist abhängig von der Güte der getrennten Fläche. Zeitmäßig ist es immer vorteilhafter, ein oder zwei grobere Schleifstufen mehr zu verwenden, als lange Zeit mit einer feineren Körnung beginnend zu schleifen. Als Beispiel sei folgende typische Scheifkörnungsreihenfolge genannt: 12, 8, 6, F 28, F 20 und F 14.
Das Schleifen als Vorstufe zum Polieren hat neben der Einebnung der Oberfläche und der Verringerung der Rauhtiefe zusätzlich noch die Aufgabe, die oft durch das Trennen hervorgerufene beträchtliche Verformung der Oberflächenzone durch den Übergang zu immer feineren Körnungen systematisch abzubauen. Dabei muß aber unbedingt beachtet werden, daß das Schleifen selbst auch zu einer Verformung in der Oberflächenzone führt.
Die Tiefe der Verformungszone tv ist im Bereich des Feinschleifens (Korngrößen-Nr. F 40 bis F 14) eine quadratische Funktion der Rauhtiefe R [517]:

unlegierter Stahl (0,05% C): $tv = 14{,}3\,R - 3{,}3\,R^2$
Elektrolytkupfer: $tv = 11{,}6\,R - 1{,}6\,R^2$.

Mit steigender Rauhtiefe im Bereich des Grobschleifens nähert sich die Verformungstiefe einem Grenzwert, der für den genannten Stahl und für Elektrolytkupfer zu etwa 15 bzw. 22 µm ermittelt wurde.
Für die praktische Metallografie ergibt sich aus diesen Erkenntnissen die Schlußfolgerung, daß es bis zur Korngröße Nr. F 28 genügt, lediglich eine Schicht abzuschleifen, die der Rauhtiefe der vorhergehenden Körnung entspricht, und erst in der Endstufe der Bearbeitung (Schleifen Korngröße Nr. F 14 und Polieren) muß die Abtragung so lange fortgesetzt werden, bis die jeweils neu entstandene verformte Zone zumindest die untere Grenze der durch die vorhergegangenen Arbeitsgänge bedingten Verformungsschicht erreicht.
Der Grad der Verformung ist außerdem stark vom Anpreßdruck, von der Art und dem Zustand der Schleifunterlage und von der Schleifvariante (Handschliff, Maschinenschliff, trocken und naß) abhängig. Entgegen vielen Meinungen, die dem Naßschleifen eine geringere Verformungstiefe zuschreiben, wurden infolge des Einflusses der Oberflächenspannung des umgebenden Mediums beim Naßschleifen experimentell größere Rauh- und Verformungstiefen als beim trocknen Schleifen unter gleichen Bedingungen gefunden.
Abgearbeitete Schleifpapiere und -bänder sind laufend zu ersetzen, und der Anpreßdruck ist, besonders beim Schleifen von Hand, der Probenabmessung sowie dem Werkstoff anzupassen und nicht zu hoch zu wählen. Damit wird gleichzeitig einer unzulässigen Erwärmung beim Schleifen, die Gefügeänderungen durch Rekristallisation, Anlassen und andere Reaktionen bewirkt, begegnet. Durch sorgfältiges Arbeiten ist weiterhin dafür Sorge zu tragen, daß nichtmetallische Einschlüsse sowie harte, spröde Verbindungen und Phasen nicht beschädigt bzw. herausgerissen werden. Schäden, die während des Vorschleifens entstehen, lassen sich nicht oder nur mit großem Aufwand beim nachfolgenden Polieren wieder beheben.
In der Regel wird unter Luft oder Wasser geschliffen. Lediglich luft- und wasserempfindliche Objekte (z.B. Alkalimetallegierungen) sind unter organischen Flüssigkeiten, Schutzgas oder Vakuum zu bearbeiten. Das Schleifmedium beeinflußt entscheidend die Wärmeentwicklung an der Probenoberfläche, die Abtragleistung sowie die Rauh- und Verformungstiefe. Die beiden letztgenannten Kenngrößen wachsen mit zunehmender Oberflächenspannung des verwendeten Mediums. Für das Naßschleifen sprechen eindeutig die wesentlich verminderte Erwärmung der Schlifffläche, die Staubfreiheit und damit der Fortfall der Schliffreinigung beim Schleifstufenwechsel und die höhere Abtragleistung.
Das Schleifen kann sowohl von Hand als auch maschinell erfolgen.
Beim Handschleifen ist darauf zu achten, daß man die Schleifpapiere, wenn kein spezielles Handschleifgerät benutzt wird, auf eine ebene harte Unterlage (z.B. Glasplatte) legt. Zum maschinellen Vorschleifen eignen sich am besten Bandschleifmaschinen, die oft als Doppelband-

schleifmaschinen ausgebildet sind. Bandnaßschleifmaschinen sind aus den schon genannten Gründen vorzuziehen. Für das maschinelle Feinschleifen werden bevorzugt Rotorschleifmaschinen mit einem oder mehreren meist horizontal, aber auch vertikal angeordneten Schleifkörpern mit und ohne Geschwindigkeitsregelung angeboten. Das Naßschleifverfahren dominiert. Die in der Praxis bewährte Drehzahl der Schleifkörper liegt bei 300 U/min. Außerdem werden Zusatzgeräte geliefert, die das Halten der Proben von Hand ersetzen und eine Teilautomatisierung ermöglichen, besonders aber auch für das wesentlich aufwendigere Polieren eingesetzt werden können. Bei einem größeren täglichen Durchsatz von Proben ist die Anschaffung je eines Schleifkörpers für jede zu benutzende Körnung zu empfehlen, um rationell ohne laufenden Körnungswechsel, der auch die Gefahr der Verschleppung von Schleifmitteln birgt, schleifen zu können. Das Arbeiten mit losen oder pastenförmigen Schleifmitteln ist in der Metallografie sehr wenig verbreitet.

Ob maschinell geschliffen werden kann oder mit Hand zu schleifen ist, hängt vom Probenmaterial und manchmal auch von der Probengestalt ab. Relativ harte Metalle und Legierungen, wie Eisen- und Kupferwerkstoffe, können maschinell geschliffen werden, weichere Werkstoffe, wie Pb und Sn, sind von Hand vorsichtig auf Schleifpapieren zu schleifen, die zuvor mit Wachs oder Paraffin abgestumpft wurden. Al-Werkstoffe können maschinell, aber auch mit abgestumpften Schleifpapieren geschliffen werden. Für äußerst harte Werkstoffe, wie Hartmetalle und Cermets, sind Diamantschleifkörper zu verwenden. Die Diamantkörner sind dort entweder im Metall (Ni, Cu, Bronze) oder im Kunstharz gebunden.

Das Vibrationsschleifen, das auf dem gleichen Prinzip wie das Vibrationspolieren beruht (s. Abschnitt 6.2.7.4.) und auf denselben Geräten durchgeführt wird, gestattet eine rationelle Gestaltung des Schleifprozesses und dürfte sich in Zukunft einer wesentlich breiteren Anwendung erfreuen.

6.2.7.4. Polieren

Das Polieren ist im allgemeinen die zeitlich aufwendigste Stufe der Schliffvorbereitung. Im Laufe der Jahre sind deshalb eine Reihe von Verfahren und Verfahrensvarianten entwickelt worden, die primär die Verkürzung der Polierzeiten zum Inhalt hatten. Aufgrund langjähriger Erfahrungen haben sich für die einzelnen Werkstoffe die jeweils günstigsten Poliervarianten herauskristallisiert, so daß heute mehrere Verfahren, teils noch in einigen Varianten, in Anwendung sind. Die dominierenden Verfahren sind z.Z. das mechanische, das elektrolytische und das elektrolytisch-mechanische Polieren.

Mechanisches Polieren

Das mechanische Polieren ist das meist angewendete Verfahren. Als Poliermittel dienen vorwiegend Tonerde (Al_2O_3), Magnesia Usta (MgO) und Diamant. Tonerde steht in drei Feinheitsstufen (1, 2 und 3) zur Verfügung, die beim Schlämmen durch Variation der Absetzzeiten (3, 12 und 24 h) erhalten werden. Für relativ harte Werkstoffe (Fe-Legierungen) ist die gröbste Sorte, Nr. 1, für mittelharte (Cu- und Ni-Legierungen) Nr. 2 und für weiche Werkstoffe (Al und Al-Legierungen, Pb) die feinste Sorte, Nr. 3, bestimmt. Magnesia Usta, bevorzugt zum Polieren von Aluminiumwerkstoffen eingesetzt, ist vor dem Gebrauch bei 800 bis 900°C zu glühen und auszusieben, weil es bei der Lagerung an Luft relativ grobe Teilchen von hartem $MgCO_3$ bildet, die es als Poliermittel unbrauchbar machen. Zum Vorpolieren dient auch feingeschlämmter Schmirgel (60 min Abstehzeit), das jedoch entfallen kann, wenn der Schliff sorgfältig auf feinem Papier geschliffen wurde. Die Poliermittel (außer Diamant) werden, in einem vom Hersteller angegebenen Verhältnis mit destilliertem Wasser aufgeschlämmt, auf die Polierunterlage (meist Tücher) aufgetragen. Als Poliertücher eignen sich Wolltuch, Klavierfilz, Billardtuch, Seide, Sämischleder, Baumwollsamt, Velvet u.a. Die beiden letztgenannten sind z.B. für Aluminiumwerkstoffe vorzuziehen. Eine strenge Zuordnung der einzelnen Tücher für bestimmte Werkstoffe ist nicht möglich, spielen doch die Qualität der Tücher, spezielle Erfahrungen und subjektive Neigungen eine beträchtliche Rolle. Als Richtlinie gilt: für harte Werkstoffe ein festes, dickes Tuch und für weichere Werkstoffe ein dünneres Tuch mit entsprechend feinerer Behaarung, wenn zu starke Reliefbildung beim Polieren vermieden werden soll.

Die Diamantpoliermittel werden in Form von Pasten in Spritzgeräten mit Stoßkolben geliefert. Es sind eine Anzahl verschiedener Körnungen zwischen 0,25 bis 40 μm im Handel, an die außerordentlich hohe Anforderungen hinsichtlich Gleichmäßigkeit und Größe der Diamantpartikel gestellt werden. Die Pasten werden auf spezielle

Diamantpoliertücher unter Zugabe besonderer Verdünnungs- oder Gleitmittel aufgetragen.
Das Polieren kann grundsätzlich von Hand oder maschinell als Rotor- oder Vibrationspolieren (s. S.330) halb- oder vollautomatisch erfolgen.
Rotorpoliermaschinen haben eine oder mehrere mit Poliertuch bespannte Polierscheiben, deren Drehzahl veränderlich ist und die außerordentlich ruhig laufen müssen. Für Serienuntersuchungen setzt sich immer mehr das automatische Polieren durch, zu dem Zusatzgeräteangeboten werden, die die Probe in einem speziellen Probenhalter in der entgegengesetzten Richtung zur Polierscheibe unter einstellbarem Druck rotieren lassen. Grundsätzlich sind auch geeignete Schleifmaschinen zum Polieren verwendbar, was jedoch nicht zu empfehlen ist, weil leicht Schleifmittelreste verschleppt werden, die die Schlifffläche beim Polieren wieder zerkratzen. Aus diesem Grund sollen auch, wenn möglich, Schleifen und Polieren räumlich getrennt durchgeführt werden.
Für Probleme, die nicht durch Probenentnahme im Labor gelöst werden können, wie Untersuchungen an großen Guß-, Schmiedestücken und Schweißkonstruktionen, stehen tragbare mechanische Schleif- und Poliergeräte zur Verfügung, die z.B. bei heterogenen Gußwerkstoffen den tragbaren elektrolytischen Poliergeräten vorzuziehen sind.
Zum Handpolieren – meist nur noch zum Endpolieren empfindlicher Werkstoffe angewandt – wird z. B. eine Glasplatte mit Poliertuch bespannt. Beides bringt man zweckmäßig in eine geeignete Schale, um die ablaufende Polierflüssigkeit abzufangen.
Beim maschinellen Polieren ist der Schliff fortlaufend langsam zu drehen oder entgegen dem Umlauf der Polierscheibe zu bewegen. Geschieht das nicht, so wird die Schlifffläche nicht gleichmäßig poliert, und hinter harten Gefügebestandteilen bilden sich unpolierte Schattenstellen aus. Im Laufe des Polierens noch sichtbare gröbere Schleifkratzer sind durch Polieren nicht oder nur unter großem Zeitaufwand zu beseitigen. Ein wiederholtes Feinschleifen ist zu empfehlen, da die Güte des Schliffs durch übertrieben langes Polieren nur leidet. Die weicheren Gefügebestandteile werden bevorzugt herauspoliert, und es entsteht ein unerwünschtes Relief.
Zum Reliefpolieren neigen alle Proben mit weichen und harten Gefügebestandteilen, weil die weicheren stärker abgetragen werden. Das Reliefpolieren kann absichtlich zur Gefügeentwicklung genutzt werden (Unterstützung durch eine weiche Polierunterlage!). Bei der Gefahr einer unbeabsichtigten Reliefbildung ist dieser durch kurze Polierzeiten und eine harte Polierunterlage zu begegnen.
Eine ähnlich differenzierte Metallabtragung beim Polieren ist durch das Ätzpolieren zu erreichen, indem dem Poliermittel ein langsam ätzender Stoff zugesetzt wird.
Unsachgemäßes Polieren kann leicht zu Fehldeutungen führen.
So ist zu beachten, daß sich Partikel von Schleif- und Poliermitteln in Poren und feinen Rissen festsetzen bzw. sich in weiche Werkstoffe eindrücken können und dann leicht bei der mikroskopischen Betrachtung Fremdeinschlüsse vortäuschen. Nichtmetallische Einschlüsse fallen bei unsachgemäßem Polieren heraus oder zerbrechen (Bild 6.222 c). Werden Werkstoffe verschiedener Art auf ein und demselben Tuch poliert, dann kann die Schlifffläche durch feine Fremdniederschläge verschmiert werden. Deshalb ist für jedes Metall mit seinen Legierungen ein eigenes Poliertuch zu verwenden. Feine Risse oder Poren können beim mechanischen Polieren duktiler Werkstoffe leicht verschmiert werden und bleiben so unentdeckt.
Obwohl noch keine in allen Einzelheiten einheitliche Auffassung über den Poliermechanismus beim mechanischen Polieren besteht, ist dieser im Zusammenwirken von Stoffabtragung und Verschmierungsvorgängen über ein plastisches Fließen, das im wesentlichen vom Poliergut, -mittel, -tuch und -druck abhängt, zu suchen. Die mechanisch polierte Oberfläche ist deshalb nie verformungsfrei; besonders bei weichen Werkstoffen ist die Oberfläche stark verformt. Diese Bearbeitungsschicht – auch Beilbyschicht genannt – ist durch vorsichtiges Schleifen und Polieren so gering wie möglich zu halten und durch geschicktes Ätzen bzw. abwechselndes Ätzen und Polieren weitestgehend zu entfernen, damit der mikroskopischen Untersuchung das durch die Präparation möglichst unbeeinflußte Gefüge zugänglich wird.
So kann z.B. die verformte Oberflächenzone an trocken geschliffenem und mit Tonerde poliertem Weicheisen, AlMg7 und Elektrolytkupfer 15 μm betragen, bei einer Verfestigung, die einer Härtesteigerung um 40 bis 70% entspricht [503].
Nach dem Polieren ist der Schliff gründlich zu säubern, d.h. mit Wasser und anschließend mit Alkohol abzuspülen, und unter dem Warmluftfön zu trocknen. Sehr intensiv können die Proben von Polierrückständen, Flecken und Verschmut-

zungen durch eine Ultraschallreinigung befreit werden.
Einen wesentlichen Fortschritt in der Metallografie bedeutete die Einführung von Diamant als Poliermittel. Damit können nicht nur sehr harte und spröde Werkstoffe poliert werden, sondern auch sehr heterogene Werkstoffe, d.h. solche mit harten spröden Einschlüssen (Schlacken) und Phasen, ohne Gefahr einer Reliefbildung.
Die große Schneidkraft des Diamanten garantiert nicht nur die Erhaltung nichtmetallischer Einschlüsse in der relativ weichen Matrix, sehr ebene Polierflächen und eine im Vergleich zum Polieren mit Tonerde wesentlich geringer deformierte Oberflächenzone, sondern auch eine beträchtliche Verkürzung der Polierdauer. Lediglich sehr weiche Werkstoffe ($\leqq$ 80 HB) sollten nicht mit Diamant poliert werden, weil bei diesen die Gefahr des Eindrückens von Diamantkörnern besteht.

Vibrationspolieren

Das Vibrationspolieren ist ein rationelles mechanisches Polierverfahren, das der Automatisierung der Schliffpräparation sehr entgegenkommt (Bild 6.227).

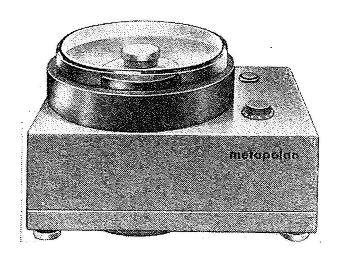


Bild 6.227. Vibrationspoliergerät metapolan
VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow, Werkfoto

Die mit Poliertuch bespannte und durch Federn mit dem Grundkörper verbundene Polierscheibe, an deren Unterseite sich das Joch eines auf einem Grundkörper montierten Elektromagneten befindet, wird beim Einschalten des Elektromagneten in eine Schwingung versetzt. Joch und Polierscheibe werden mit der Frequenz des verwendeten Wechselstroms angezogen und durch die Federn wieder in die Ausgangslage gebracht. Aufgrund der Winkelanordnung der Federn zum Grundkörper erfährt der Polierteller bei der Abwärtsbewegung zusätzlich noch eine axiale Verdrehung. Bedingt durch die Trägheit der Probe, kann sie der Bewegung der Polierscheibe nicht exakt folgen und gleitet deshalb entgegengesetzt zur axialen Rückbewegung der Polierscheibe auf konzentrischen Kreisen um deren Mittelpunkt. Die Schwingungsamplitude ist so einzustellen, daß die Proben bei gleichmäßiger Fortbewegung noch eine zusätzliche Drehung um die eigene Achse machen. Fehlt die Drehbewegung, dann ist die Schwingungsamplitude zu klein; ist sie zu groß, so hüpfen die Proben. Zur Beschleunigung des Prozesses sind kleinere Proben zu belasten, um einen ausreichenden Anpreßdruck, dessen Höhe von der Härte des Materials abhängt, zu erreichen. Als Poliermittel können sowohl Diamant als auch oxidische Poliermittel, wie Al_2O_3 oder MgO, verwendet werden.
Die besonderen Vorteile des Vibrationspolierens liegen in der guten Randschärfe der Schliffe und den gegenüber den bisher behandelten Verfahren wesentlich besseren Ergebnissen, die beim Polieren von spröden Werkstoffen und solchen mit spröden Phasen (Sinterwerkstoffe, Keramik, nichtmetallische Einschlüsse, Stellite) erzielt werden. Die Polierzeit ist im Vergleich zu den anderen Verfahren größer, wird aber dadurch ausgeglichen, daß gleichzeitig mehrere Proben (etwa bis 12 Stück), auch unterschiedlichsten Werkstoffs (mit Ausnahme von Bronzen, weil sie bei zahlreichen anderen Werkstoffen Schmierschichten erzeugen), wartungsfrei poliert werden können [521].
Beim elektrolytischen Vibrationspolieren, dessen Anwendung sich z.B. für Kupferwerkstoffe bewährt hat [507], wird der Poliereffekt durch einen zusätzlichen elektrochemischen Abtrag beschleunigt.

Elektrolytisches Polieren

Das elektrolytische Polieren [511] [515] hat in letzter Zeit breite Anwendung in vielen metallografischen Laboratorien gefunden.
Anfängliche Fehlschläge und daraus resultierende Vorurteile dürften die Einführung dieses Verfahrens vielerorts verzögert haben. Die Schwierigkeit besteht darin, alle das Polierergebnis beeinflussenden Faktoren, wie Elektrolytzusammensetzung, -temperatur, -strömungsgeschwindigkeit, Stromdichte, Polierspannung, Schliffgröße, Elektrodenabstand und Polierzeit, beherrschen zu können. Erst mit der Schaffung kommerzieller metallografischer Poliergeräte konnte man dieser Schwierigkeit wirksam begegnen, indem einige Größen (Strömungsgeschwindigkeit, Polierfläche, Elektrodenabstand) konstant gehalten werden und andere (Spannung, Stromdichte) reproduzierbar zu beeinflussen sind.

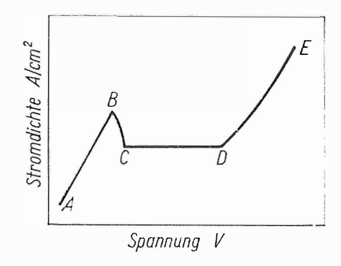


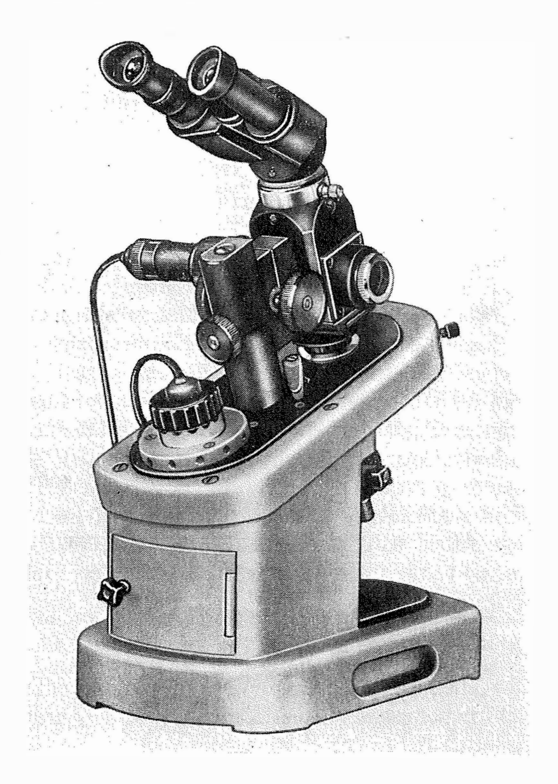
Bild 6.228. Schematische Stromdichte-Spannungs-Kurve

AB: Ätzen; *BC:* Deckschichtenbildung; *CD:* günstiger Polierbereich; *DE:* Sauerstoffentwicklung

Das Prinzip des elektrolytischen Polierens besteht darin, die Probe als Anode zu schalten und einer, je nach Gerät, speziell geformten Katode (z.B. aus X10CrNi 18.9) so gegenüber anzuordnen, daß zwischen beiden der Elektrolyt mit einer über die gesamte Polierfläche konstanten Strömungsgeschwindigkeit fließen kann.
Mit zunehmender Spannung wird das Material anodisch im Bereich *CD* der Stromdichte-Spannungs-Kurve (Bild 6.228), das Oberflächenprofil einebnend, gelöst. Dieser Poliereffekt ist noch nicht in allen Einzelheiten bekannt, dürfte aber auf das Ausbilden fester und flüssiger Anodenschichten angewiesen sein, die über die lokale Beeinflussung chemischer und elektrochemischer Faktoren (Stromdichte, Konzentrationsgradient, elektrische Leitfähigkeit) zu einer unterschiedlichen Abtragung an den Erhebungen und in den Vertiefungen führen.
Mit steigender Spannung beobachtet man oft im Anschluß an den Bereich *AB*, in dem das Anodenmaterial direkt in Lösung geht, die Bildung einer Schicht dunkler Reaktionsprodukte (Bereich *BC*), die dann aufreißt und vom Elektrolyten weggespült wird.
Optimale Polierergebnisse sind bei Verwendung geeigneter Elektrolyten im Spannungsbereich *CD* zu erhalten. Das Gebiet rechts vom Punkt *D* ist wegen der eintretenden Sauerstoffentwicklung zu meiden. Meist wird das elektrolytische Polieren mit einem anschließenden elektrolytischen Ätzen abgeschlossen, wozu, je nach Werkstoff, entweder die Spannung vermindert oder der Polierstrom unterbrochen und mit ansteigender Spannung im Bereich *AB* geätzt wird. Bei einigen Werkstoffen (z.B. austenitische Cr-Ni-Stähle) werden aber günstigere Ergebnisse erzielt, wenn nur elektrolytisch poliert und anschließend chemisch nachgeätzt wird.

Im Laufe der Entwicklung sind eine Vielzahl von Elektrolytlösungen für die einzelnen Werkstoffe erprobt und empfohlen worden, deren Anzahl durch die Schaffung einiger Universalelektrolyte etwas eingeschränkt wurde, aber immer noch sehr groß ist und die, abgesehen von einigen Zusammenstellungen [502] [512] [530], in der Literatur in einem breiten Rahmen verstreut zu finden sind.
Die auf dem Markt angebotenen Geräte erlauben z.T. ein automatisches Polieren und Ätzen, wobei sowohl für das Polieren als auch für das Ätzen Spannung und Stromdichte gewählt und eingestellt werden können, z.T. eine gleichzeitige mikroskopische Verfolgung des Polier- und Ätzvorgangs (Bild 6.229).
Für das Anpolieren großer Werkstücke bzw. von Teilen stationärer Anlagen wurden tragbare elektrolytische Poliergeräte entwickelt, die entweder mit speziellen Polierköpfen ausgerüstet sind oder nach dem Verfahren des Tamponpolierens, das an keine ebene Oberfläche gebunden ist, arbeiten. Die Untersuchung des Gefüges erfolgt entweder direkt mit einem aufsetzbaren Mikroskop oder indirekt über Abdruckfolien.

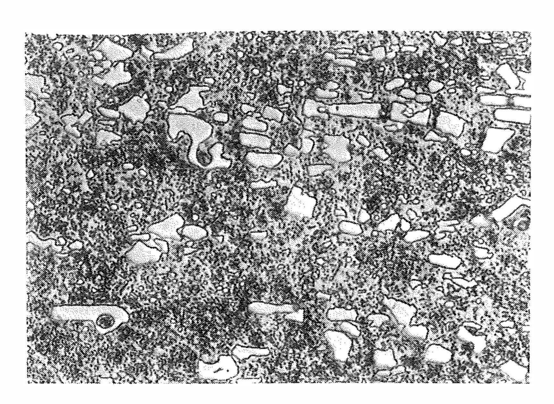
Bild 6.229. Elektrolytisches Poliergerät ELYPOVIST
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



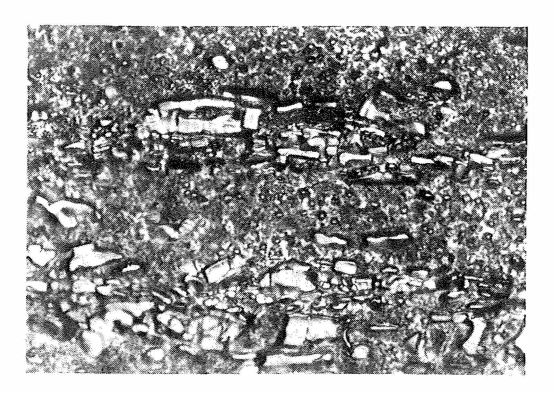
Das elektrolytische Polieren vereint den Vorteil einer sehr kurzen Polierzeit mit der Herstellung einer verformungsfreien Oberfläche.
Die Polierzeit liegt in der Regel zwischen 20 und 180 s; je besser vorgeschliffen, desto kürzer die Polierdauer. Die durch das Schleifen deformierte Oberflächenzone wird bei ausreichender Polierdauer verformungsfrei abgetragen. Auch die beim mechanischen Polieren leicht zugeschmierten Risse können durch elektrolytisches Polieren eindeutig dargestellt werden. Besonders für relativ weiche, leicht verformbare Werkstoffe, die nur mit großem Aufwand mechanisch polierbar sind und bei denen immer die Gefahr besteht, daß die Bearbeitungsschicht auf der Oberfläche das wahre Gefüge verdeckt, stellt das elektrolytische Polieren das nahezu ideale Verfahren dar.
Die genannten Vorteile lassen aber das elektrolytische Polieren noch zu keinem Universalpolierverfahren werden, das durch einige verfahrensbedingte Nachteile – wie Schwierigkeiten beim Polieren heterogener Werkstoffe mit Komponenten stark unterschiedlichen elektrochemischen Potentials infolge selektiven Abtragens, die bei den handelsüblichen Geräten begrenzte Polierfläche und der starke Randabfall – auch nur eine, aber wertvolle und sehr umfangreich genutzte Ergänzung zu den anderen Polierverfahren darstellt.
Für heterogene Werkstoffe empfiehlt es sich, sehr fein vorzuschleifen und danach nur ganz kurz zu polieren (Bild 6.230). Bei Grauguß kann man sich z. B. auch so helfen, den im Relief stehenbleibenden Graphit nachträglich durch ein wenige Sekunden dauerndes mechanisches Polieren abzutragen. Dieses Wechselpolieren ist ebenfalls anzuwenden, wenn eine den Polierprozeß hemmende Deckschicht beim elektrolytischen Polieren entsteht. Sie kann durch ein zwischengeschaltetes mechanisches Polieren aufgerissen werden.
Für die Untersuchung nichtmetallischer Einschlüsse (Schlacken) in metallischen Werkstoffen ist das elektrolytische Polieren nicht geeignet. Eingebettete Proben können nur poliert werden, wenn die Einbettmasse vom Elektrolyten nicht angegriffen wird und die Probe stromleitend Kontakt hat (Verwendung stromleitender Einbettmassen).

Chemisches Polieren

Das chemische Polieren, das ebenso wie das elektrochemische ein verformungsfreies Polieren gestattet, hat in der Praxis wenig Verbreitung ge-



a) fein vorgeschliffen, kurz poliert



b) grob vorgeschliffen, relativ lange poliert

Bild 6.230. 100Cr6, elektrolytisch poliert und geätzt M 500 : 1

funden. Die Oberfläche des Schliffs wird meist in Säuregemischen unter Abtragen der Oberflächenrauhigkeiten glatt gebeizt und das Mikrogefüge durch nachträgliches Ätzen mit metallografischen Ätzmitteln entwickelt. Für heterogene Werkstoffe ist eine Kombination von chemischem und anschließendem mechanischem Polieren vorteilhafter.

Elektrolytisches Wischpolieren

Das elektrolytische Wischpolieren – eine Kombination von elektrolytischem und mechanischem Polieren – stellt eine sehr wertvolle Ergänzung zum elektrolytischen Polieren dar, weil es eine Erweiterung des Anwendungsbereichs auf anodisch sehr schwer polierbare und heterogene Legierungen erlaubt.
Die als Anode geschaltete Probe wird dabei über die langsam rotierende tuchbespannte Polierscheibe, die als Katode geschaltet und mit einem

geeigneten Elektrolyten getränkt ist, gewischt. Je nach Werkstoff kann sowohl ohne als auch mit Zusatz eines mechanischen Poliermittels gearbeitet werden. Die Polierbereiche (Polierspannung, Stromdichte) sind beim Elektrowischpolieren nicht kritisch eng.

Für die Edelmetalle Ag, Au, Pt, Pd und deren Legierungen ist das Elektrowischpolieren die geeignetste, schnellste und zuverlässigste Poliermethode [523], auch bei sehr heterogenen Gefügen. Der Elektrolytlösung wird in der Regel kein Poliermittel zugesetzt. Diese Proben müssen nachträglich, obwohl bei heterogenen Werkstoffen das Gefüge bereits nach dem Polieren angedeutet wird, noch geätzt werden.

Das Verfahren ist nicht allein auf Edelmetalle beschränkt, auch Cu und Cu-Legierungen, Ni, Ti sowie W, Be, Mo und Fe-Werkstoffe lassen sich mit gutem Erfolg elektrolytisch wischpolieren.

Zur Bearbeitung der letztgenannten Werkstoffe wird dem Elektrolyten ein mechanisches Poliermittel (Tonerde) zugesetzt. Die Polierzeiten können dabei im Vergleich zum mechanischen Polieren um ein bis zwei Zehnerpotenzen gesenkt werden (z. B. für Fe-Werkstoffe [513] auf 1 bis 5 min). Eine Reliefbildung, wie sie beim mechanischen und elektrolytischen Polieren (Bild 6.230 b) sehr heterogener Werkstoffe zu beobachten ist, tritt beim elektrolytischen Wischpolieren nicht auf.

6.2.7.5. Mikrotomschneiden

Ein bereits recht lange bekanntes, aber bis jetzt verhältnismäßig wenig genutztes Verfahren ist das Mikrotomschneiden, das mit Rücksicht auf die Standzeit der Messer jedoch auf weiche Werkstoffe mit einer Vickershärte unter 200 HV zu beschränken ist. Die Probe wird mit dem Messer eines Mikrotoms unter Abtrennung feinster Späne (1 bis einige µm Spandicke) überschnitten, so daß sich das Schleifen und z. T. auch das Polieren erübrigen.

Als Messerwerkstoff dienten zunächst gehärteter Stahl und Hartmetall; in jüngster Zeit wurden mit bestem Erfolg Diamantmesser eingesetzt.

Hohe Randschärfe der Schliffe, keine Reliefbildung (besonders bei Verbund- und beschichteten Werkstoffen), kein Verschmieren der Oberfläche bzw. Zuschmieren von Mikrofehlstellen sowie die Möglichkeit des definierten Materialabtrags ohne Eindrücke von Schleif- und Poliermitteln sind gepaart mit dem geringen Aufwand, Vorteile, die das Überschneiden weicher Werkstoffe mit dem Mikrotom den übrigen Präparationsverfahren überlegen erscheinen lassen.

Besonders bei sehr weichen Werkstoffen, die sonst beim Schleifen stark in ihrer Oberfläche verformt werden, wie Pb und Sn, sowie bei den Edelmetallen Au, Ag, Pd [524] ergeben sich nach dem Überschneiden in vielen Fällen direkt ätzbare Oberflächen mit sofort auswertbaren Gefügen. In manchen Fällen erfordert jedoch die beim Überschneiden stattgefundene Verformung (durch starke Gleitlinienbildung) eine Nachpolitur (mechanisch, besser elektrolytisch oder durch Elektrowischpolieren), um die durch die Verformung beeinflußte Gefügezone abzubauen. Optimale Schneiden- und Anstellwinkel des Messers, die noch zu ermitteln sind, dürften ein Verformungsminimum erzielen lassen. Die Verwendung von Diamantmessern brachte eine wesentliche Qualitätssteigerung der überschnittenen Oberfläche im Vergleich zu Hartmetallmessern. Sie ermöglicht eine breitere Anwendung des Verfahrens auch bei härteren Werkstoffen.

Zusätzliche Bedeutung gewinnt das Überschneiden mit Diamantmessern als Vorbereitung für Proben zur Untersuchung mit der Mikrosonde, die absolut ebene Probenflächen erfordert.

6.2.7.6. Entwicklung des Gefüges

In der Praxis sind die Gefügebestandteile, die man beobachten möchte, oft groß genug, um vom Auflösungsvermögen her getrennt wahrnehmbar zu sein, unterscheiden sich aber im Reflexionsvermögen nur wenig voneinander, so daß sie im mikroskopischen Bild kaum oder nicht erkennbar kontrastieren. Die notwendige Kontraststeigerung wird deshalb in der Metallografie auf unterschiedlichem Wege erreicht:

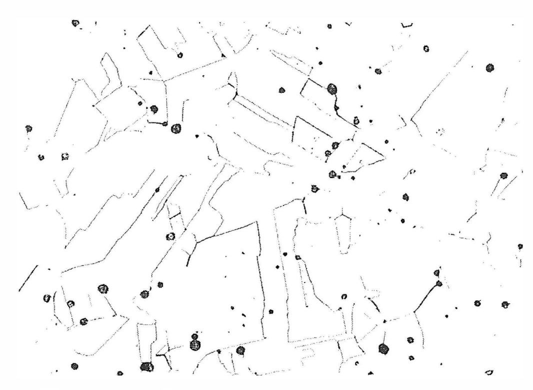
- optische Hilfsmittel (Polarisation, Hell- und Dunkelfeldbeleuchtung, Filter, Phasenkontrast, Interferenzkontrast)
- Änderung der Probenoberfläche (Reliefpolieren)
- Bildung von Oberflächenschichten (Bedampfen, meist auch beim chem. oder elektrochem. Ätzen)
- Abtrag von Oberflächenschichten (katodisches Ionenätzen).

Nur für relativ wenig metallografische Untersuchungen genügt eine polierte Schliffoberfläche. An ihr können z. B. nichtmetallische und metallische Einschlüsse, wie Graphit im Gußeisen (Bild 6.222) sowie Sulfide und Oxide in Kupfer und Stahl (Bild 6.220), Pb in Kupferlegierungen

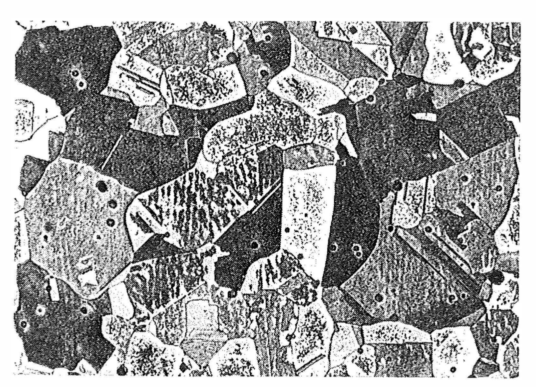
und freies Si in Al-Si-Legierungen, Risse, Lunker, Porosität, pulvermetallurgische Werkstoffe und Korrosionsangriffe beurteilt werden.
Ein ausgesprochenes Reliefpolieren wird nur selten zur Gefügeentwicklung genutzt.
Die folgenden Ausführungen sollen sich im wesentlichen auf das Ätzen, das älteste und zugleich meist angewendete Verfahren zur Kontraststeigerung, beschränken.

Ätzen

Das Ätzen basiert bei den meisten Verfahrensvarianten auf einem elektrochemischen Angriff, der je nach Zusammensetzung der Phasen und Orientierung der Kristalle differenziert abläuft [527]. Für die einzelnen Werkstoffe und Untersuchungszwecke wurden eine Vielzahl von Ätzmitteln erprobt, die der Fachliteratur [501] [505] [508] [529] [530] zu entnehmen sind.
In der Praxis unterscheidet man grundsätzlich zwischen der Makroätzung, die zur makroskopischen Betrachtung bis etwa 30facher Vergrößerung dient und wegen der bei diesen geringen Vergrößerungen zulässigen großen Tiefenausdehnung mit stark aggressiven Ätzmitteln vorgenommen werden kann, und der Mikroätzung, die im Vergrößerungsbereich 50- bis 2000fach eine gute Entwicklung des Feingefüges unter Einhaltung der für die gegebene Vergrößerung zulässigen Tiefenausdehnung ermöglichen soll.
Eine Korngrenzenätzung bewirken die Ätzmittel, die die einzelnen Körner (Kristallite) ohne wesentlichen Angriff der Kornfläche abbauen (Bild 6.231 a). Sie ist abhängig von der Größe des Korngrenzenwinkels und beruht auf dem unterschiedlichen orientierungsabhängigen Potential der Kristallite. Zu einer Kornflächenätzung führen die Ätzmittel, deren Angriff differenziert von der Lage des Kristalls, d.h. dem Winkel zur Schliffebene, orientierungsabhängig erfolgt und mit einer Aufrauhung der Kornfläche bei einer im Vergleich zur Korngrenzenätzung größeren Tiefenausdehnung verbunden ist (Bild 6.231 b).
Kornflächenätzungen, die durch dünne Niederschlagshäute auf der Schliffoberfläche entstehen, werden auch als Farbätzungen genutzt. Die Farbwirkung kommt durch Interferenzerscheinungen der je nach Gefügebestandteil und Orientierungsunterschied niedergeschlagenen Häute verschiedener Dicke zustande.
Zum Nachweis der Kristallorientierung dienen neben der Kornflächen-, der Farbätzung und der Erzeugung von Anlauffarben die Kornfigurätzung und die Schraffurätzung. Während bei der üb-



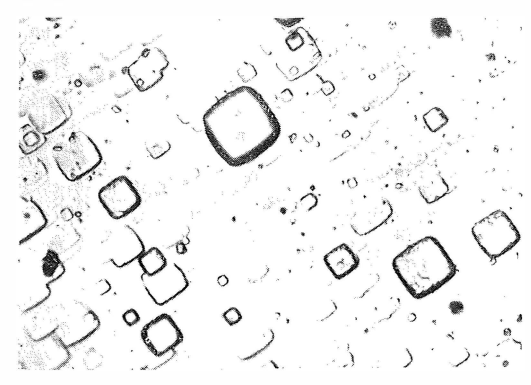
a) Korngrenzenätzung, elektrolytisch geätzt



b) Kornflächenätzung, geätzt mit ammoniakalischer Kupferammoniumchloridlösung

Bild 6.231. Kupfer, elektrolytisch poliert
M 250:1

Bild 6.232. Ätzfiguren auf einer Cr-Diffusionsschicht, elektrolytisch poliert
Ätzmittel:
25 cm³ H_2O; 5 bis 8 g $CuCl_2$;
5 bis 10 cm³ HCl;
M 800 : 1



lichen Kornflächenätzung der Angriff des Ätzmittels mehr oder weniger gleichmäßig über die gesamte Kornfläche erfolgt, wird bei Anwendung bestimmter Ätzmittel und geeigneter Lösungsbedingungen ein von bestimmten Punkten ausgehender Angriff festgestellt, der zu Ätzfiguren (Ätzgrübchen) mit geometrisch definierten Formen führt (Bild 6.232). Die Begrenzung der Ätzfiguren entspricht den Schnittlinien bestimmter kristallografischer Netzebenen mit der Ebene des metallografischen Schliffs.

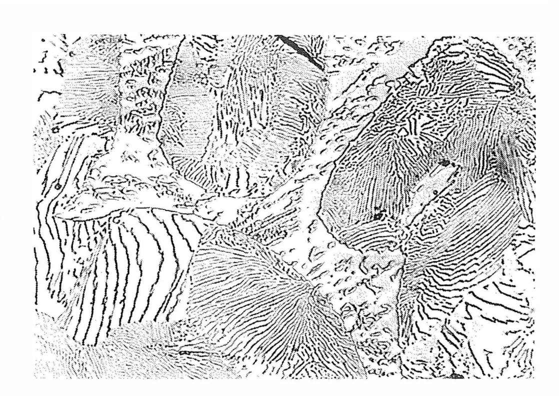
Bei der Schraffurätzung treten in der sich während des Ätzvorgangs auf der Schliffoberfläche bildenden Reaktionsschicht beim Trocknen infolge der Schrumpfspannungen Risse in Form eines charakteristischen Rissemusters auf, das in einem gewissen Zusammenhang mit der kristallografischen Lage der unter dem Belag liegenden Phase steht [527].

In der Praxis bedient man sich zur Gefügeentwicklung verschiedener Ätzarten.

Das einfache Tauchätzen ist am gebräuchlichsten. Dabei wird am zweckmäßigsten der Schliff zur Verfolgung des Ätzvorgangs mit der Oberfläche nach oben in die Ätzlösung, die z.T. auch erwärmt wird, getaucht und, damit keine das Ätzergebnis beeinträchtigenden lokalen Konzentrationsunterschiede entstehen, die Probe oder die Ätzschale bewegt. Eine Abart – das Ätzwaschen – wird bei großen Proben angewendet, indem man das Ätzmittel bis zum gewünschten Ätzgrad über die geneigte Schlifffläche fließen läßt. Entstehen während des Ätzvorgangs auf der Schlifffläche unerwünschte Niederschläge, so kann die Ätzung mit einem in der Ätzlösung getränkten Wattebausch durch Reiben der Schlifffläche durchgeführt werden. Beim Ätzpolieren wird die chemische bzw. elektrochemische Gefügeentwicklung durch das Ätzmittel mit der Reliefbildung infolge des Polierens kombiniert.

In bestimmten Fällen wird auch eine Mehrfachätzung, d.h. eine nacheinanderfolgende Ätzung der gleichen Objektstelle mit mehreren Ätzmitteln, angewendet (Bild 6.233). Die zu beobachtende Objektstelle kann mit einem Objektmarkierer eingekreist und somit leicht wiedergefunden werden.

Das elektrolytische Ätzen wird im Prinzip wie das elektrolytische Polieren, nur bei geringeren Spannungen durchgeführt. Meist eignen sich die gleichen Elektrolyte, so daß es im Anschluß an das Polieren im gleichen Gerät durchgeführt werden kann. Es wird bevorzugt bei den Werkstoffen angewendet, die sich in den üblichen Ätzmitteln



a) vorgeätzt mit 1 %iger HNO_3



b) Zweitätzung mit alkalischer Natriumpikratlösung

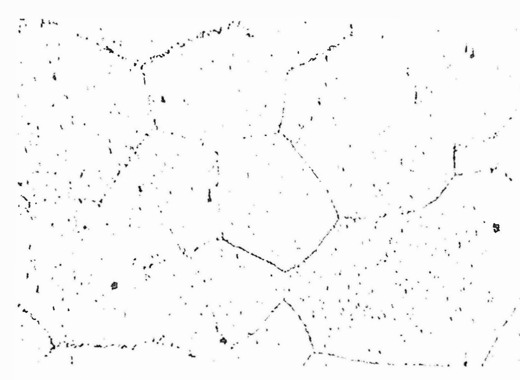
Bild 6.233. Grauguß, Phosphideutektikum
M 500:1

schwer anätzen oder passiv verhalten (Bild 6.234).

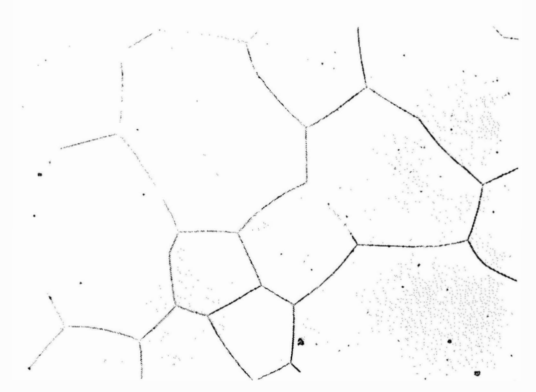
Das elektrolytisch-potentiostatische Ätzen gestattet, das Potential der Probe, bezogen auf eine Normalelektrode, weitgehend konstant und unabhängig vom Strom zu halten und, da alle ablaufenden Reaktionen im wesentlichen vom Elektrodenpotential abhängen, nur die gewünschte Reaktion ablaufen zu lassen.

Das Verfahren, das apparative Voraussetzungen bedingt, läßt auf dem Gebiet der Farbätzung sehr feine Unterschiede (Seigerungen) mit einer Sicherheit sichtbar werden, die keine andere Methode erreicht [518].

Beim Ätzen durch Anlauffarben nutzt man die Tatsache aus, daß sich die einzelnen Gefügebestandteile entsprechend ihrer Zusammensetzung, Gitterstruktur und Orientierung beim Erwärmen mit Oxidschichten verschiedener Dicke bedecken und infolge von Interferenzerscheinungen in den sog. Anlaßfarben farbig erscheinen.



a) mit Königswasser geätzt



b) elektrolytisch poliert und geätzt

Bild 6.234. Cr-Diffusionsschicht auf StTZb, Schliffebene parallel zur Oberfläche, senkrecht zur Diffusionsrichtung
M 500:1

Zur Untersuchung magnetischer Bereichsstrukturen dienen die Bitter- und Kerrtechnik [514], die den durch eine Kolloidlösung infolge von Konzentrationsdifferenzen der braun erscheinenden Eisenoxidkolloidteilchen an Stellen mit verschiedenen Feldgradienten entstehenden optischen Kontrast bzw. den magnetooptischen Kerreffekt nutzen.
Zu den wichtigsten, jeweils einzuhaltenden Ätzbedingungen gehören die Zusammensetzung der Ätzlösung, deren Temperatur und die Ätzdauer. Letztere ist wiederum abhängig von der Temperatur, dem Dissoziationsgrad der Lösung, der chemischen Zusammensetzung und dem Flächenanteil der einzelnen Phasen sowie von der Bewegung der Probe in der Ätzlösung und wird bei Kurzzeitätzungen in der Regel durch visuelle Verfolgung des Ätzangriffs gewählt. Der Ätzvorgang ist durch intensives Spülen der Probe in Wasser (oder Alkohol bei niedergeschlagenen Häuten, die in Wasser löslich sind und erhalten bleiben sollen) zu unterbrechen. Anschließend sind die Proben in Alkohol zu spülen und unter einem Heißluftfön zu trocknen, damit Korrosionserscheinungen unterbleiben. In Schliffklammern gefaßte Proben und solche mit Rissen, Lunkern und Poren sind besonders gut zu spülen und lange zu trocknen, damit sie später keine Ätzlösungsreste bzw. Wasser- oder Alkoholreste ausschwitzen und die präparierte Schlifffläche verderben.
Mikroschliffe werden im allgemeinen in Exsikkatoren aufbewahrt; große Schliffflächen von Makroschliffen können durch einen Lacküberzug (Zaponlack) vor atmosphärischem Angriff geschützt werden.

Ionenätzen, Gasätzen

Das Ionenätzen, auch als katodisches Vakuumätzen bezeichnet, beruht im Gegensatz zu den bisher genannten Ätzverfahren auf physikalischen und physikalisch-chemischen Vorgängen. Bei diesem Verfahren wird die Schliffoberfläche mit energiereichen Ionen (1 bis 10 keV) im Vakuum beschossen, wobei Atome so abgestäubt werden, daß das Gefüge auf der Probenoberfläche hervortritt. Ionenmasse, Einfallsrichtung und Beschleunigungsspannung beeinflussen das Ätzergebnis. Empfohlen werden z. B. mit 5 kV beschleunigte Argonionen unter einem Einfallswinkel von 45° [531]. Das Verfahren setzt eine sehr sorgfältige Schliffvorbereitung voraus, weil es sehr empfindlich auf Gitterstörungen (z. B. Kratzer) reagiert.
Das Ionenätzen (besonders auch geeignet für die Elektronenmikroskopie) gestattet bei einer Vielzahl chemisch und elektrochemisch schwer ätzbarer Werkstoffe oder solchen mit Bestandteilen großer Potentialdifferenz eine aussagekräftige Gefügeentwicklung bei sauberer, von chemischen Fremdstoffen rückstandsfreier Oberfläche (Bild 6.223 a). Des weiteren wird das Verfahren in der „heißen Metallografie" für die Präparation radioaktiver Werkstoffe eingesetzt [510]. Besonders vorteilhaft ist die Anwendung des Ionenätzens bei porösen Objekten, bei denen es oft schwierig ist, ein sauberes Gefüge zu erhalten, weil die in die Poren eingedrungene Ätzlösung später wieder heraustritt und die Schliffoberfläche verdirbt [525].
Im Gegensatz zum Ionenätzen beruht das Gasätzen [516] auf der Anlagerung von Gasionen an der polierten Oberfläche und die Ätzwirkung auf dem entstehenden Farbkontrast. Nach Evakuie-

ren der Probenkammer wird ein Ätzgas eingelassen und das Ionisieren durch einen Elektronenstrahl zwischen Katode und Probe eingeleitet.

Gefügeentwicklung durch Interferenzaufdampfschichten

Als eine wertvolle Ergänzung zu den bisher üblichen metallografischen Verfahren zur Kontraststeigerung bieten sich in jüngster Zeit Interferenzaufdampfschichten zur Gefügeentwicklung an.
Dieses rein physikalische Verfahren läßt durch Bedampfen der polierten Oberfläche mit dünnen Interferenzschichten auf optischem Weg die Gefügestruktur sichtbar werden. Dabei werden geringe Unterschiede im Reflexionsvermögen, die unterhalb der Wahrnehmbarkeitsgrenze (< 10%) liegen, durch Mehrfachreflexion verstärkt, so daß noch Gefügebestandteile, deren Reflexionsvermögen sich nur um 2 bis 3% unterscheidet, mit Sicherheit differenziert werden können.
Als Schichtwerkstoffe, von denen eine hohe Brechzahl und eine geringe Restabsorption gefordert werden, eignen sich besonders CdS, ZnTe, InP, ZnS, ZnSe, TiO_2, Sb_2S_3 [498] [504] [526].

6.2.7.7. Beurteilung und Auswertung des metallografischen Befunds

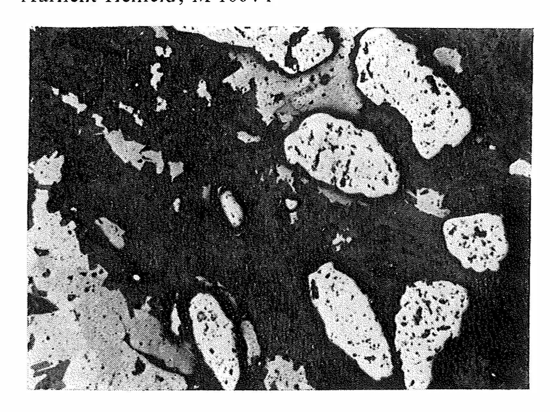
Eine Grundregel der praktischen Metallografie besagt, sich zunächst bei niedriger Vergrößerung einen Überblick über das Objekt zu verschaffen und erst dann mit hoher Vergrößerung das Augenmerk auf Einzelheiten zu richten.
Hauptvoraussetzung für eine Beurteilung und Auswertung des metallografischen Befunds ist eine einwandfreie Präparation des Objekts. Eine umfassende Beurteilung und Auswertung sind jedoch nur dann gesichert, wenn sowohl die metallografischen Präparations- und die Beobachtungsbedingungen (Schleif-, Polier-, Ätzverfahren, Ätzmittel, Vergrößerung, Licht- und Beleuchtungsart) als auch Daten über das Objekt und dessen Vorgeschichte bekannt sind. Dazu zählen im wesentlichen Angaben über die Zusammensetzung des Objekts, dessen Verformungs- und Wärmebehandlungszustand sowie über technologisch bedingte Eingriffe in die Gefügestruktur (z. B. Schweißen und Löten) und die Stelle des Objekts, von der die Probe entnommen wurde.
Die Beurteilung und Auswertung des metallografischen Befunds haben auf Grundlage der bestehenden Standards zu erfolgen.
Gegenwärtig ist ein deutlicher Trend von der qualitativen Beurteilung zur quantitativen Auswertung (Messen und Zählen) unter Einbeziehung von Kleinrechnern und Druckern zu beobachten [499].
Die quantitative Metallografie erstreckt sich bevorzugt auf die Korngrößenbestimmung, die metallografische Phasenanalyse und die Ermittlung von nichtmetallischen Einschlüssen nach Anzahl, Form, Flächenanteil, Durchschnittsgröße und Größenverteilung.
In der Praxis wird der metallografische Befund in vielen Fällen durch das Ergebnis anderer parallel durchzuführender Werkstoffprüfverfahren indirekt bestätigt und ergänzt.

6.2.7.8. Herstellen polierter Anschliffe von stark heterogenen natürlichen und technischen Produkten

von Ing. *Joachim Bergner*

Bei natürlichen und technischen Produkten ist oft eine starke Streuung der Härtewerte der einzelnen Komponenten anzutreffen. Die mechanischen Polierverfahren der Metallografie würden bei diesen Proben eine Oberfläche mit sehr starkem Relief erzeugen (Bild 6.235). Reaktionsprodukte oder spröde Einschlüsse auf Zwischenkornplätzen werden größtenteils aus dem Verband herausgerissen und gehen der Untersuchung verloren.
Diese Schwierigkeiten, die besonders bei der Präparation von Erzen und keramischen Proben auftraten, führten zu einem besonderen Präparationsverfahren und einer hierauf konstruierten Schleif- und Poliermaschine für Erze durch *Rehwald* [522], mit der Erzanschliffe bisher nicht bekannter Qualität hergestellt werden konnten.

Bild 6.235. Handpolierter Erzanschliff mit starkem Relief und Ausbrüchen
Auflicht-Hellfeld; M 100 : 1



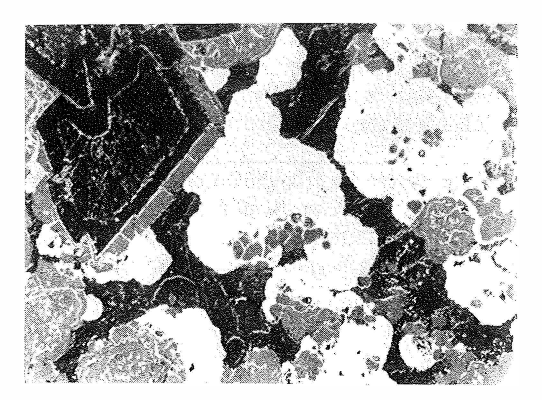


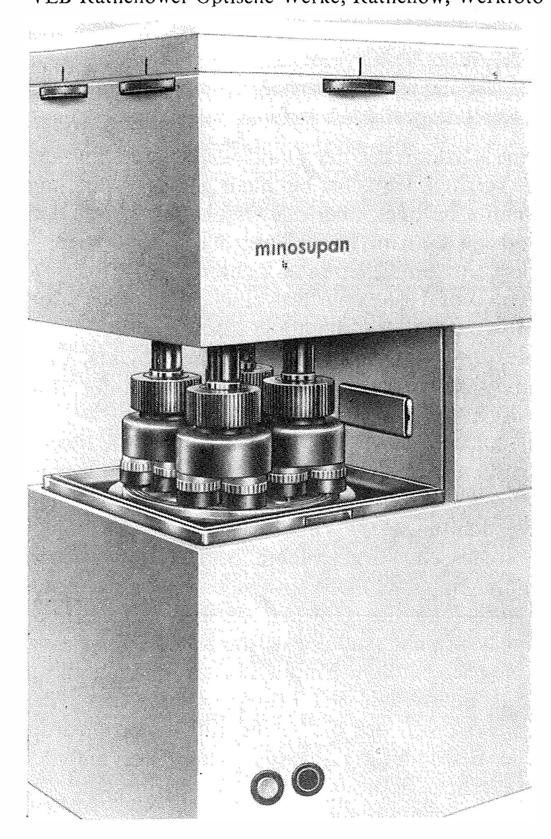
Bild 6.236. Erzanschliff, nach dem Vanderwilt-Rehwald-Verfahren poliert; kein Relief und keine Ausbrüche
Auflicht-Hellfeld; M 125 : 1

Einige der dem Rehwald-Verfahren zugrunde liegenden Prinzipe wurden bereits früher von *Vanderwilt* angegeben [533], jedoch konnte sich diese Methode damals nicht durchsetzen. Das Verfahren basiert auf folgenden Prinzipien:

1. Die zu bearbeitenden Proben werden gleichzeitig drei verschiedenen Bewegungsabläufen unterworfen. Dadurch wird das Auftreten von in einer Richtung bevorzugten Schleifschatten vermieden.
2. Zur Vermeidung tiefgreifender Materialzerstörungen wird die maximale Korngröße des Schleifmaterials auf 20 bis 30 µm beschränkt.
3. Die Bearbeitung der Proben erfolgt nicht mit frei rollendem, sondern mit eingebettetem schneidendem Schleifkorn. Voraussetzung hierzu ist die Verwendung von Schleifkörpern aus weichen Metallen (PbSb-Legierungen).
4. Die Bearbeitung der Proben erfolgt bei der Temperatur, bei der sie später auch beobachtet werden; demzufolge werden die Proben über den Schleifkörper laufend gekühlt.
5. Es werden nur geringste Mengen genau klassierter Schleifmittel verwendet.
6. Als Schleifhilfsstoff wird nicht Wasser, sondern Öl verwendet.

Die nach diesem Verfahren hergestellten Erzanschliffe zeichnen sich durch eine hervorragende Relieffreiheit und durch vollständige Erhaltung aller Einschlüsse aus (Bild 6.236).
Mit der Verbesserung der Präpariertechnik wurde gleichzeitig eine Steigerung der Effektivität der Schliffherstellung verbunden, indem die Schleifmaschine für die gleichzeitige Bearbeitung mehrerer Proben eingerichtet wurde. Die Bearbeitung erfordert jedoch nach wie vor ein hohes Einfühlungsvermögen und Erfahrung des Schliffpräparators, weil Zeitpunkt und Menge der Schleifmittelzugabe entscheidend für die Schliffqualität sind. Je besser die einzelnen Bewegungsvorgänge der Schleifprobe auf der Maschine aufeinander abgestimmt sind, desto geringer wird der Einfluß der genannten Faktoren. Einen wesentlichen Fortschritt in dieser Richtung verzeichnen die vom VEB Rathenower Optische Werke hergestellten Anschliffeinrichtungen minosupan und montasupal, die sich außerdem durch eine noch größere Rationalität auszeichnen, weil sie die gleichzeitige Bearbeitung von mehreren Schliffen gestatten (Bild 6.237).
Bei Verwendung der Schleif- und Poliereinrichtungen nach dem Vanderwilt-Rehwald-Verfahren kann folgender allgemeiner Ablauf für die Präparation heterogener Materialien angegeben werden:

Bild 6.237. Teilansicht der Anschliffeinrichtung minosupan. Spindeln, mit je drei Proben besetzt, in Arbeitsstellung
VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow, Werkfoto



1. Stufe: Schneiden der Probe

Die maschinelle Probenbearbeitung erfordert die Anwendung standardisierter Probenaufnahmen, die meist in Ringform vorliegen. Von der natürlichen Probe müssen daher geeignete Stücke für die Aufnahme in diesen Probenhaltern abgetrennt werden. Hierbei darf es zu keiner Deformation der Mikrostruktur der Probe kommen. Am besten eignet sich zum Abtrennen der Probestücke eine Trennschleifmaschine (z. B. minosecar), die für das Trennen petrografischer und keramischer Proben, von Zementproben und feuerfestem Material mit einem Diamanttrennschleifkörper ausgerüstet sein muß. Diamanttrennschleifkörper mit kontinuierlichem Rand sind denen mit gekerbtem Rand vorzuziehen. Das Trennschleifen erfolgt in jedem Fall unter laufender Kühlung von Probe und Schleifkörper.

2. Stufe: Einbetten der Probe

Zum Einbetten der Probe in die Probenaufnahme werden Epoxidharze bevorzugt. Die Harze sollen nicht zu hart eingestellt werden und sich durch ein möglichst geringes Schrumpfen beim Aushärten auszeichnen. Gute Erfahrungen wurden mit Epilox EGK 19 + Härter 5 (VEB Leunawerke) und mit Araldit B (CIBA, Basel) gesammelt. Probenhalter und Probe sind vor dem Einbetten sorgsam zu entfetten. Ring und Probe werden mit der zu bearbeitenden Seite auf eine vorher dünn mit Silikonöl eingeriebene Dezelith- oder trockene Plexiglasplatte gelegt (dabei zweckmäßig mit einer geeigneten Vorrichtung gegen diese Platte gedrückt) und das flüssige Harz-Härter-Gemisch darübergegossen. Luftblasen müssen dabei sorgsam vermieden werden. Aus dem gleichen Grund soll das Ansetzen des Gemisches unter laufender Kühlung erfolgen. Nach 24 h Härtezeit bei Raumtemperatur wird ein Nachhärten von etwa 6 h bei etwa 50 bis 60°C im Trockenofen empfohlen. Dies vermindert eine spätere Deformation der Harzoberfläche aufgrund von langzeitigen Aushärteeffekten. Poröse Proben müssen vor dem Einbetten getränkt werden (s. Abschn. 6.1.9.4.). Hierzu wird das gleiche Harz wie beim Gießen verwendet.

3. Stufe: Schleifen der Probe

Nach dem Aushärten des Präparats kann die untergelegte Scheibe leicht von der Oberfläche abgesprengt werden. Der Probenring wird jetzt auf einer Drehmaschine mit einer etwa 3 mm breiten 45°-Facette versehen und anschließend auf einer Glasscheibe mit einer 20-µm-Schmirgelaufschwemmung die erste ebene Fläche angeschliffen. Dieser Vorschliff entfällt beim Anwenden von Plexiglasplatten. Die Probe ist nun maschinenfertig. Normalerweise werden auf der Maschine drei Schleifstufen durchgeführt, und zwar mit 20-µm-, 6-µm- und 2-µm-Schleifkorn (vorzugsweise Borkarbid in einer pastenförmigen Zubereitung). Als Schleifhilfsstoff wird ein 2 : 1-Gemisch von Petroleum und Paraffinöl verwendet, wobei die angewendete Flüssigkeitsmenge mit feiner werdendem Schleifkorn immer geringer zu wählen ist. Zum Erreichen bester Qualität müssen die Schleifzeiten sehr lange angesetzt werden. Stufe 1 erfordert 90 min, Stufe 2 120 min und Stufe 3 etwa 180 min.

4. Stufe: Polieren

Polieren ist bei dem Vanderwilt-Rehwald-Verfahren Schleifen mit feinstem Korn. Zum Vorpolieren wird Aluminiumoxid von 1 µm Korngröße, zum Feinpolieren Magnesiumoxid von 0,5 bis 0,8 µm Korngröße verwendet. Das Vorpolieren kann bis zum Beseitigen der letzten Kratzer und Ausbrüche bis zu mehreren Stunden dauern. Für Routineuntersuchungen sind so lange Polierzeiten natürlich nicht erforderlich, auch kann das nachfolgende Feinpolieren entfallen. In beiden Polierstufen wird ohne Schleifhilfsstoff gearbeitet; die Feuchtigkeit des pastenförmigen Poliermittels reicht aus. Der Schleifdruck ist gegenüber den vorherigen Schleifstufen wesentlich zu erhöhen und mit etwa 20N/Probe gegenüber 6N/Probe beim Schleifen anzusetzen. Dabei ist der Schleifdruck der Probenhärte anzupassen; weiche Proben erfordern geringeren Druck als härtere. Während beim Schleifen durchaus verschiedenartiges Material gleichzeitig bearbeitet werden kann, ist bei den Polierstufen möglichst nur gleichartiges Material gleichzeitig zu polieren.

7. Stereomikroskopie

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer*

7.1. Stereoskopisches Sehen

Das echte stereoskopische Sehen setzt die Beobachtung mit beiden Augen voraus. Es beruht auf der Tatsache, daß durch den Augenabstand, der im Mittel etwa 64 mm beträgt, die Blickrichtung auf einen Gegenstand für jedes Auge unterschiedlich ist und somit die beiden Netzhautbilder nicht identisch sind. Erst im Gehirn werden die beiden Bilder zu einem einzigen Gesamteindruck verarbeitet, der zu einer räumlichen Darstellung führt. Es ist deshalb bei nicht zu weit entfernten Gegenständen nicht schwer zu erkennen, welcher vorn und welcher hinten liegt.
Allerdings ist die räumliche Wahrnehmung nicht allein durch das stereoskopische Sehen begründet. Es hat sich gezeigt, daß auch einäugige Personen ein relativ gutes Tiefenwahrnehmungsvermögen besitzen, das aber allein durch die Erfahrung begründet ist und in seiner Leistungsfähigkeit nicht mit dem einer auf beiden Augen sehtüchtigen Person konkurrieren kann, ganz zu schweigen von der Anwendung des stereoskopischen Effekts zum Ausmessen der Raumbilder durch Entfernungsmeßgeräte und Stereokomparatoren, z. B. zur Auswertung von Luftbildaufnahmen.
Im gewöhnlichen monobjektiven Mikroskop beobachtet man normalerweise, auch bei Verwendung eines binokularen Tubus, gleichzeitig nur eine Ebene, nämlich die Schärfenebene, bzw. einen schmalen Tiefenbereich, der der Schärfentiefe entspricht. Die gleichzeitig innerhalb dieses Bereiches sichtbaren Objekte erscheinen alle in die gleiche Ebene projiziert. Eine direkte Tiefenunterscheidung ist auf diese Weise nur schwer zu erreichen. Erst durch Nachfokussieren des Objektivs ist es möglich, tiefenrichtige Angaben über die Lage der einzelnen Objekte und Objektdetails zu machen. Allerdings kann auch hier die Erfahrung in beschränktem Maße weiterhelfen.
Selbstverständlich muß zur Tiefenwahrnehmung das zu untersuchende Präparat eine gewisse Tiefe haben, so daß die Stereomikroskopie bei der Untersuchung von Metallschliffen kaum Vorteile bringt. Außerdem ist bei räumlichen Objekten die Erzeugung eines deutlichen stereoskopischen Effekts nur innerhalb der Tiefenschärfe des Objektivs möglich. Das sind die wesentlichen Gründe, weshalb die Beobachtungsmethode fast ausschließlich für schwache Vergrößerungen angewendet wird, z. B. zur Präparierung für die Licht- und Elektronenmikroskopie, in der Industrie zur Montage und Prüfung feinmechanischer und elektronischer Geräte und Bauelemente sowie in der Medizin in Form der Kolposkopie und als Operationsmikroskop. In der Ophthalmologie bildet es einen festen Bestandteil des Spaltleuchtengeräts zur Beobachtung des vorderen und des hinteren Augenabschnitts. In allen diesen Fällen muß man zur schnellen Orientierung am Untersuchungsgegenstand bzw. zum sicheren Heranführen der erforderlichen Werkzeuge oder zu montierenden Bauelemente an die richtige Stelle ein tiefen- und auch seitenrichtiges Bild verlangen. Diese Forderungen lassen sich auf verschiedene Weise erfüllen.

7.2. Realisierung der Stereomikroskopie

Von *H.S. Greenough* [534] ist im Jahre 1892 vorgeschlagen worden, zwei getrennte Tuben mit je einem Objektiv und einem Okular etwa 14 bis 16° zueinander geneigt an einem Stativ zu befestigen und das Bild mit beiden Augen zu beobachten. Dieser Winkel entspricht etwa dem Konvergenzwinkel der Augen bei Akkommodation auf einen in der konventionellen Sehweite von 250 mm gelegenen Gegenstand. Damit die Bilder auch seiten- und höhenrichtig werden, ist zwischen jedem Objektiv *2* und Okular *4* (Bild 7.1) ein bildaufrichtendes Porroprisma *3* eingeschaltet, das in seiner einfachsten Form aus zwei senkrecht zueinander verkitteten, gleichen rechtwinkligen Prismen besteht, an denen die Strahlen 4mal reflektiert werden und sowohl in der Zeichenebene

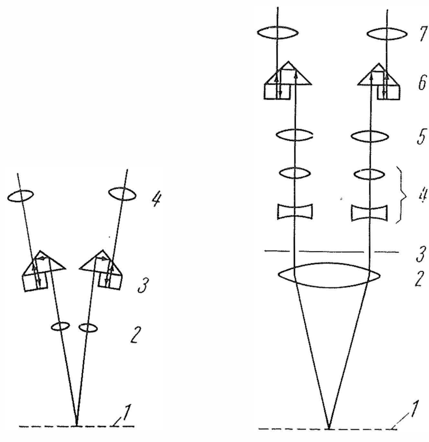


Bild 7.1 (links). Optisches Schema des Stereomikroskops vom Greenough-Typ
1 Objektebene; *2* Objektiv; *3* Porroprisma; *4* Okular

Bild 7.2 (rechts). Optisches Schema des Stereomikroskops TECHNIVAL
VEB Carl Zeiss JENA
1 Objektebene; *2* Objektiv; *3* Blende; *4* Galileisches Fernrohrsystem; *5* Tubuslinse; *6* Porroprisma; *7* Okular

als auch senkrecht dazu eine Parallelverschiebung erleiden. Im ersten durchlaufenen Prisma werden die Seiten und im zweiten die Höhen vertauscht. Der Vergrößerungswechsel geschieht durch Auswechseln der Objektive und der Okulare. Ein solches Mikroskop ist erstmalig von *Carl Zeiss*, Jena, kommerziell hergestellt worden. Wegen der notwendigen geringen Objektivapertur ist die nutzbare Vergrößerung auf etwa 200- bis 250fach beschränkt. Es werden jedoch auch schon Ausrüstungen bis 320fach angeboten. Der Arbeitsabstand hängt von dem verwendeten Objektiv ab und liegt im allgemeinen zwischen 15 und 100 mm.

Bei dem seit 1946 vom VEB Carl Zeiss JENA hergestellten SM XX, das in seiner den modernen Ansprüchen angepaßten Form und Ausrüstung heute als TECHNIVAL angeboten wird (Bild 7.2.), kommt nur ein, und zwar auf unendlichen Bildabstand korrigiertes Objektiv zur Verwendung.
Eine hinter dem Objektiv gelegene Blende *3* sondert aus dem vom Objektiv erzeugten Parallellichtbündel zwei Teilbündel aus, von denen jedes getrennt über die Tubuslinse *5* und ein Porroprisma *6* in das Okular *7* gelangt. Durch das Prisma erfolgt neben der Bildaufrichtung gleichzeitig eine Knickung des Strahlengangs für den Schrägeinblick. Außerdem ermöglicht es die Einstellung des Okularstutzens auf den Augenabstand des Beobachters. Der Vergrößerungswechsel erfolgt durch ein zwischen Objektiv und Porroprisma eingeschaltetes Galileisches Fernrohrsystem *4*, also ohne Objektivwechsel. Zwei Paare dieser Fernrohrsysteme mit den Vergrößerungen 1,6 × und 2,5 × sind so auf einer Schaltwalze angeordnet, daß sie sowohl in positiver als auch in negativer Richtung durchsetzt werden können, somit vergrößernd oder verkleinernd wirken oder auch beide ausgeschaltet werden können. Das Objektiv allein hat die Vergrößerung 1,6 ×. In Verbindung mit den Fernrohrsystemen geht demnach der Vergrößerungsbereich von 0,63 × bis 4,0 × und mit den verwendeten Okularen 6,3 × und 25 × von 4 × bis 100 ×. Der Arbeitsabstand ist in jedem Fall konstant 100 mm.
Die eindeutigen Vorteile dieses Geräts gegenüber denen vom Greenough-Typ, wie konstanter Arbeitsabstand, bequemer Vergrößerungswechsel, werden durch eine etwas geminderte Bildqualität erkauft, weil beide Teilstrahlen das Objektiv schräg durchsetzen. Für die verschiedenen Stellungen der Schaltwalze ergeben sich mit der Grundausrüstung die Vergrößerungswerte nach Tafel 7.1.

Tafel 7.1. Werte der Vergrößerung und des Dingfelddurchmessers für verschiedene Stellungen der Schaltwalze

Okulare	Anzeige für Objektivvergrößerung in Verbindung mit den Fernrohrsystemen					Arbeitsabstand, etwa
	0,63	1,0	1,6	2,5	4,0	
	Gesamtvergrößerung					
	Dingfelddurchmesser mm					mm
6,3 ×	4 ×	6,3 ×	10 ×	16 ×	25 ×	100
	44	28	17,5	11	7	
25 ×	16 ×	25 ×	40 ×	63 ×	100 ×	100
	12,5	8	5	3	2	

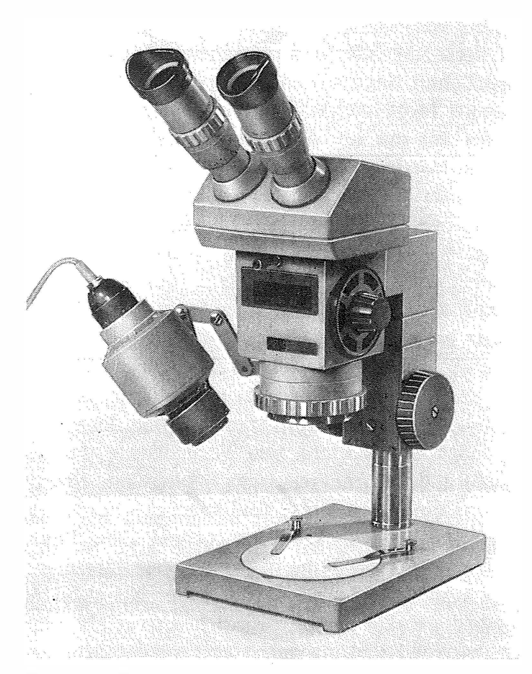


Bild 7.3. Stereomikroskop TECHNIVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Der Aufbau des Geräts ist im Bild 7.3. dargestellt. Es besteht aus einer Grundplatte mit Säule, an der das eigentliche Mikroskop mit Objektiv, Schaltwalzen, Binokulartubus und die Leuchte für Auflichtbeleuchtung festgeklemmt werden. Für Durchlichtbeleuchtung wird ein besonderer Durchleuchtungsuntersatz verwendet. Die Möglichkeiten der vielseitigen Anwendung werden unterstützt durch besondere Zusatzeinheiten, z. B. den schon erwähnten Durchleuchtungsuntersatz mit und ohne Polarisationseinrichtung und den Kugeltisch zum Neigen der Probe. Durch entsprechende Ausführung des Stativs ist die Verwendung normaler Mikroskoptische möglich.

Das Mikroskop kann auch vom Stativ abgenommen und zur Untersuchung besonders großer Proben an ein Mehrzweckstativ mit weiter Ausladung angesetzt werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, es mit einem Spezialstativ oder einer besonderen Haltestange, deren Durchmesser dem der Säule entspricht, direkt an die Maschine oder einen speziellen Laboraufbau zu montieren. In der Medizin wird es als Kolposkop (Bild 7.4.), als Operationsmikroskop oder in der Ophthalmologie als Spaltleuchtengerät (Bild 7.5.) verwendet.

Bild 7.4. Stereomikroskop am Kolposkop 120
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

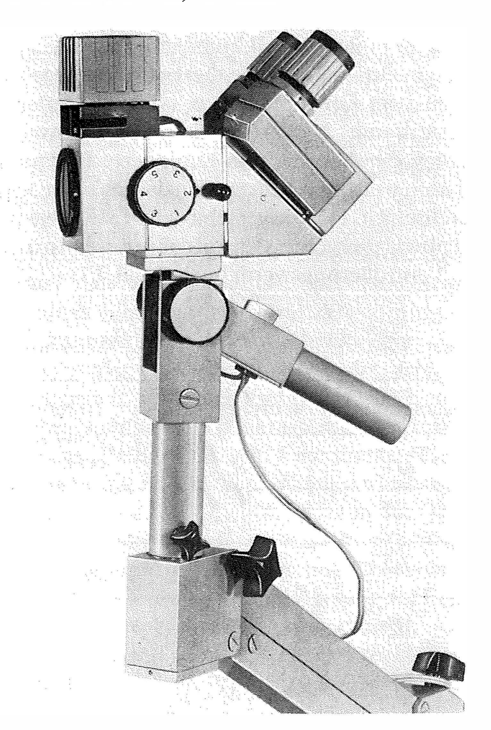
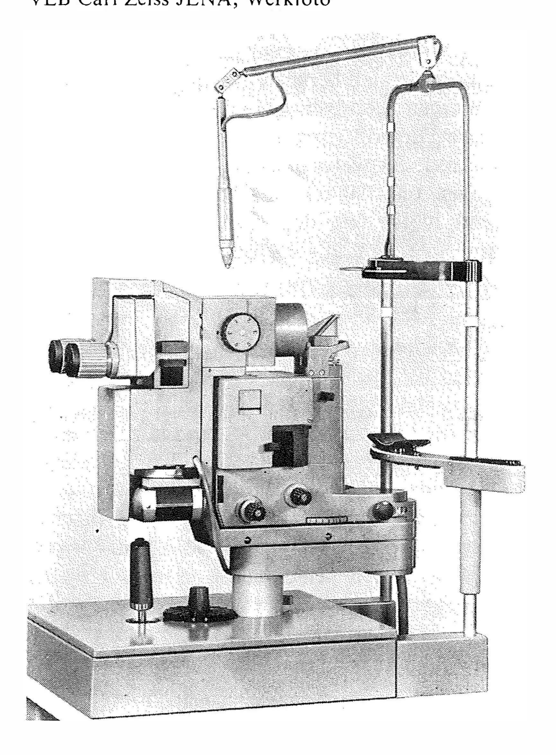


Bild 7.5. Spaltleuchtengerät
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



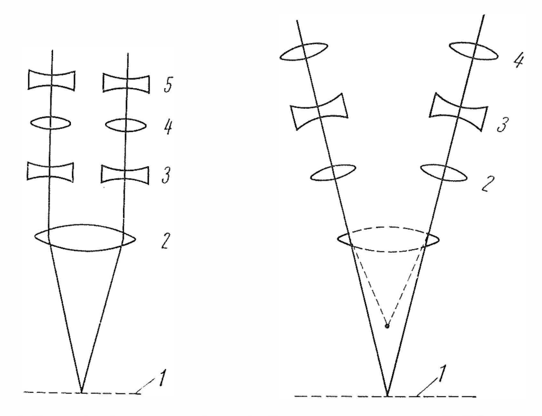


Bild 7.6 (links). ZOOM-System mit einem Objektiv
Firma Olympus
1 Objektebene; *2* Objektiv; *3* Linsengruppe; *4* Linsengruppe; *5* Linsengruppe

Bild 7.7 (rechts). ZOOM-System mit zwei Objektiven
American Optical Company
1 Objektebene; *2* Objektiv; *3* Linsengruppe; *4* Linsengruppe

Von verschiedenen Herstellern sind Stereomikroskope mit kontinuierlich veränderlicher Vergrößerung entwickelt worden. Es werden dafür sowohl der Galilei-Typ mit einem Objektiv (Bild 7.6.) als auch der Greenough-Typ mit zwei Objektiven (Bild 7.7) verwendet.

Das Grundprinzip entspricht dem im Abschn. 2. beschriebenen und erstmalig am Universalforschungsmikroskop NU zur kontinuierlichen Vergrößerungsänderung im Abbildungsstrahlengang verwendeten pankratischen System. In der englischen Literatur wird es als Zoom-System bezeichnet, und die damit ausgestatteten Stereomikroskope werden unter der Bezeichnung Stereo-Zoom-Mikroskope angeboten.

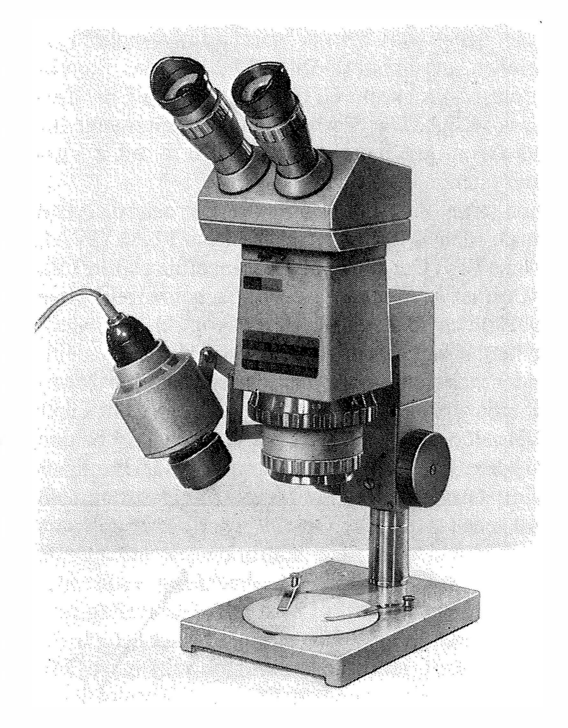
Bei der Anordnung mit einem Objektiv wird das Galileische Fernrohrsystem im Bild 7.2 durch dieses System ersetzt, dessen Brennweite durch Verschieben mehrerer Linsen gegeneinander stufenlos regelbar ist, wodurch sich eine entsprechende Änderung der Gesamtvergrößerung ergibt. Dabei müssen über den gesamten Verschiebebereich Bildebene und Bildqualität erhalten bleiben. Bei den meisten Geräten lag zunächst das Verhältnis von Maximal- zu Minimalvergrößerung zwischen 4 und 5, in Einzelfällen auch über 5 bis 7. Der VEB Carl Zeiss JENA erreicht mit seinem neu entwickelten CITOVAL (Bild 7.8) ein Vergrößerungsverhältnis von 10. Diese Zahlen sind natürlich noch kein Gütekriterium, weil hierbei die Bildqualität eine entscheidende Rolle spielt und bei Verwendung desselben Objektivs nur ein beschränkter Vergrößerungsbereich sinnvoll ausgenutzt werden kann.

Im Bild 7.6 ist das vereinfachte optische Schema des Zoom-Systems mit einem Objektiv der Firma Olympus und im Bild 7.7 das der American Optical Company mit zwei Objektiven dargestellt.

Im Bild 7.6 werden, von der kleinsten Vergrößerung beginnend, zunächst die untere Linsengruppe *3* etwa bis zur Mitte nach oben und die obere Linsengruppe *4* nach unten und schließlich beide nach unten verschoben, wobei zur Einhaltung der Bildlage und des optimalen Korrektionszustands die vorher berechneten relativen Verschiebungen genau eingehalten werden müssen. Die Linsengruppe *5* ändert dabei ihre Lage nicht.

Im Bild 7.7 werden mit zwei Objektiven zum kontinuierlichen Vergrößerungswechsel die Linsengruppen *3* und *4* zueinander und relativ zum Objektiv *2* verschoben. Die Relativbewegung der verstellbaren Linsengruppen wird bei den meisten Geräten durch eine Kurvenscheibe gesteuert. Zur Verlagerung des gesamten Vergrößerungsberei-

Bild 7.8. Stereo-ZOOM-Mikroskop CITOVAL
VEB Carl Zeiss JENA



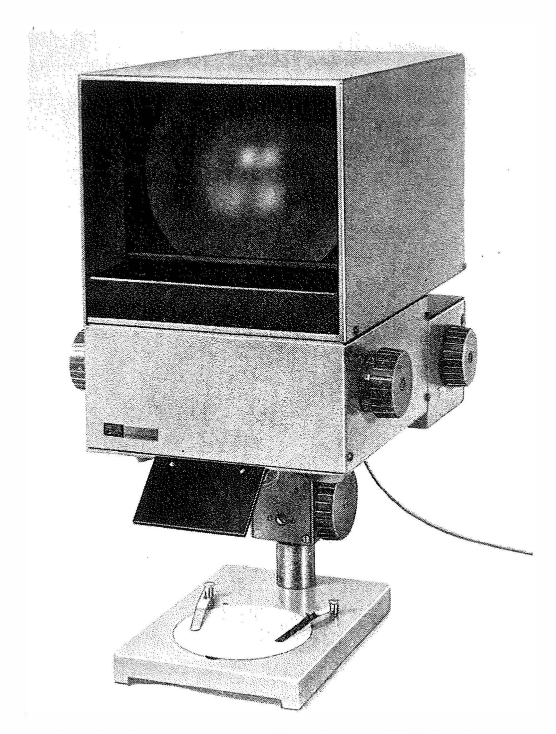


Bild 7.9. Mikrostereoprojektor PLASTIVAL 50
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

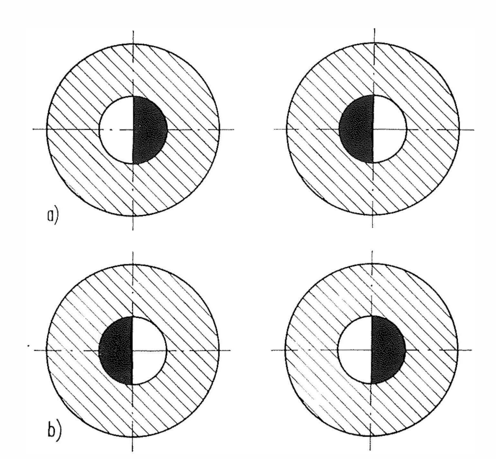


Bild 7.10. Halbblenden zur stereoskopischen Beobachtung
a) stereoskopische Anordnung;
b) pseudoskopische Anordnung

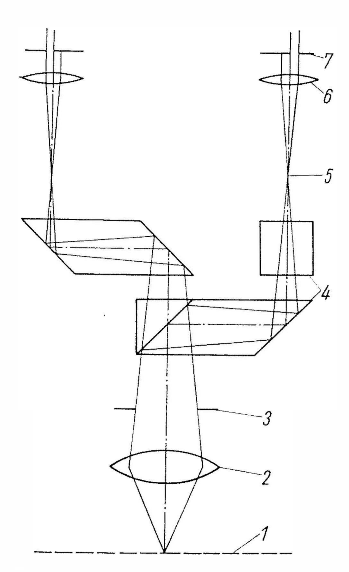


Bild 7.11. Optisches Schema zur stereoskopischen Beobachtung mit Halbblenden
1 Objektebene; *2* Objektiv; *3* Objektivaustrittspupille; *4* Prismensystem; *5* Zwischenbildebene; *6* Okular; *7* Halbblende

ches nach oben oder unten kann noch eine positive oder negative Linse vorgeschaltet werden (gestrichelt gezeichnet). Bild 7.8 zeigt das Stereo-Zoom-Mikroskop CITOVAL des VEB Carl Zeiss JENA. Der Vergrößerungsbereich geht für das Grundgerät von 10 × bis 100 × mit 2 Vorsatzsystemen von 5 × bis 200 ×.

Eine neue Variante der Stereomikroskopie wird durch den Mikrostereoprojektor PLASTIVAL 50 des VEB Carl Zeiss JENA eingeführt (Bild 7.9). Damit ist es möglich, ein Mattscheibenbild ohne zusätzliche Hilfsmittel stereoskopisch zu beobachten. Die beiden Teilbilder werden mit zueinander geneigten Strahlenbündeln auf die Mattscheibe projiziert, die in Kombination mit einer Fresnellinse eine diffuse Abbildung der beiden Pupillen erzeugt. Der Abstand dieser Pupillenbilder entspricht dem mittleren Augenabstand, so daß jedes Auge das Objekt unter verschiedenem Blickwinkel sieht und somit die Voraussetzung für eine stereoskopische Beobachtung erfüllt ist.

Neben der stereoskopischen Beobachtung mit besonderen Stereomikroskopen besteht auch die Möglichkeit, dafür normale monobjektive Mikroskope zu verwenden. Die Beobachtung kann direkt oder über die Mikrofotografie erfolgen. Im ersten Fall führt die Verwendung eines binokularen Tubus nach Abschn. 2.7. bzw. 4. in Verbindung mit den schon von Abbe vorgeschlagenen Halbblenden (Bild 7.10) zum Ziel, die als Kappen auf die beiden Okulare aufgesetzt werden. Ihre Wirkung läßt sich anhand der Darstellung im Bild 7.11 folgendermaßen erläutern:

Das im Tubus befindliche Prismensystem *4* erzeugt in beiden Okulartuben einen zueinander identischen Strahlenverlauf, so daß in der Zwischenbildebene *5* zwei gleiche Bilder des Objekts und hinter den Okularen, in der Austrittspupille des Mikroskops, bei *7* zwei gleiche Bilder der Objektivaustrittspupille *3* entstehen. Beiden Augen wird das gleiche Bild dargeboten; es entsteht somit kein stereoskopischer Effekt. Ordnet man jedoch bei *7* die genannten Halbblenden wie im Bild 7.10a an, so daß jeweils die innere Hälfte der Austrittspupille des Mikroskops abgedeckt wird, dann werden den Augen zwei unterschiedliche Bilder dargeboten. Das rechte Auge beobachtet das Objekt mit der rechten und das linke Auge mit der linken Hälfte der Objektivapertur. Das Objekt erscheint also, wie bei jeder echten stereoskopischen Beobachtung, den beiden Augen mit unterschiedlichem Blickwinkel, wodurch die tiefenrichtige Wahrnehmung eines räumlichen Objekts ermöglicht wird. Werden nun die Halbblenden, wie im Bild 7.10b dargestellt, gedreht, dann sieht das rechte Auge das Objekt mit der linken und das linke Auge mit der rechten Hälfte der Objektivapertur, woraus ein sog. pseudoskopisches Bild resultiert. Dabei ist das Tiefenunterscheidungsvermögen gegenüber dem Fall a) nicht gemindert, jedoch die Darstellung nicht mehr tiefenrichtig. Die tieferliegenden Objektdetails erscheinen höherliegend und umgekehrt die höherliegenden tieferliegend.

Mit dieser Methode läßt sich leicht nachweisen, daß die stereoskopische Beobachtung nicht etwa, wie z.T. angenommen wird, auf schwache Objektive beschränkt ist. Der Verfasser hat selbst, unter Verwendung eines Objektivs mit der Apertur 1,35, ausgezeichnete stereoskopische Effekte nachweisen können. Besonders eindrucksvoll läßt sich die stereoskopische Wirkung z.B. an den im Abschnitt 6.1.8. beschriebenen Zertrümmerungssternen in Kernspuremulsionen demonstrieren.

Allerdings hat diese Methode der Stereomikroskopie einen Nachteil, der nicht verschwiegen werden soll. Die Halbblenden müssen möglichst exakt in der Austrittspupille des Mikroskops angeordnet werden, wo sich, um das ganze Gesichtsfeld gleichzeitig übersehen zu können, die Augenpupille befinden muß. Da das jedoch in diesem Fall nicht möglich ist, können nicht beide Augen gleichzeitig das gesamte Bildfeld übersehen, und durch eine Art Schlüssellochbeobachtung ist der stereoskopische Effekt nur in einem relativ schmalen Bereich des Bildfelds vorhanden. Dieser Mangel ließe sich zwar durch eine Zwischenabbildung beheben, doch bringt die Stereomikroskopie bei starken Objektiven offenbar nicht den Gewinn, daß sich der dafür erforderliche Aufwand lohnen würde.

Die Methode der Halbblenden kann auch, unter Vermeidung des soeben beschriebenen Mangels, mit polarisiertem Licht verwirklicht werden, indem man beleuchtungsseitig in der vorderen Kondensorbrennebene als Halbblenden Polarisationsfolien einsetzt, deren Schwingungsrichtungen aufeinander senkrecht stehen. Mit entsprechend orientierten Polarisationsfiltern in den beiden Tuben erhält jedes Auge nur das Licht, das einseitig zur optischen Achse in die Objektebene eingefallen ist. Das entspricht zwar nicht exakt der vorher beschriebenen Halbblendenmethode, doch lassen sich auch so gute stereoskopische Effekte erzielen.

Fotografisch können mit jedem normalen Mikroskop stereoskopische Aufnahmen hergestellt werden. Man kann das Objekt, wie in den Bildern 7.12a und b dargestellt, relativ zur optischen Achse drehen oder seitlich verschieben und von den Stellungen *1* und *2* je eine Aufnahme machen. Da die so gepaarten Aufnahmen die Bedingung für das stereoskopische Sehen erfüllen (sie erscheinen unter verschiedenem Blickwinkel), erhält man ein gutes stereoskopisches Bild, wenn jedem Auge nur eines der beiden Bilder dargeboten wird. Das ist am leichtesten mit einem einfachen Stereobetrachter, der im wesentlichen eine Doppellupe darstellt, zu erreichen. Einem geübten Beobachter gelingt die stereoskopische Betrachtung auch ohne zusätzliche optische Hilfsmittel. Durch Variation des Drehwinkels oder der Größe der Objektverschiebung läßt sich der stereoskopische Effekt beliebig verstärken oder abschwächen. Durch Vertauschen der beiden Bilder erhält man auch hier den schon beschriebenen pseudoskopischen Effekt.

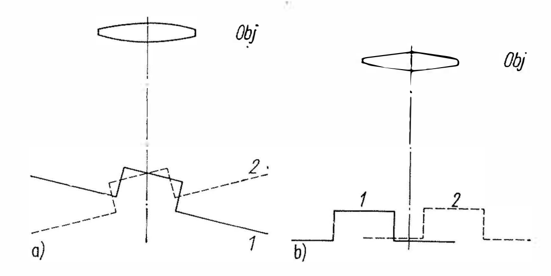


Bild 7.12. Anfertigung stereoskopischer Aufnahmen

a) durch Drehen;
b) durch Verschieben des Objekts

7.3. Anwendungen

Das Stereomikroskop ist ursprünglich für rein biologische Zwecke, z.B. als Hilfsmittel zur Anfertigung und Kontrolle der für mikroskopische und später auch elektronenmikroskopische Untersuchungen erforderlichen Präparate, sowie zur Untersuchung von Kleintieren, Insekten, Pflanzen und Pflanzenteilen entwickelt worden. Heute werden die Ultramikrotome zur Anfertigung von Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie von den Herstellern – zur Kontrolle des Schnittvorgangs und der Schnitte – mit einem Stereomikroskop ausgerüstet oder Möglichkeiten für das Ansetzen eines solchen vorgesehen (Bild 7.13).

In der Medizin hat sich das Stereomikroskop mit schwacher Vergrößerung, z.B. in Form des Kolposkops für diagnostische Zwecke, besonders zur Früherkennung des weiblichen Genitalkarzinoms einen festen Platz erobert. Aufgrund der mit dem Gerät möglichen Frühdiagnose kann ein sich entwickelndes Karzinom durch einen relativ kleinen Eingriff rechtzeitig unschädlich gemacht werden. Auch bei Erkrankung anderer, von außen zugänglicher Organe sowie als optisches Hilfsmittel bei der Operation spielt das Stereomikroskop eine wichtige Rolle. Seine schon erwähnten Varianten sind das Operationsmikroskop für die Hals-Nasen-Ohren-Chirurgie sowie das Spaltleuchtengerät und die Operationsspaltleuchte für die Ophthalmologie.

Mit der Entwicklung der modernen Technik, z.B. im Maschinen- und Gerätebau, der Uhren- und Schmuckindustrie, der Textilindustrie, doch besonders der elektronischen Industrie, die immer stärker zu einer Miniaturisierung drängt, hat sich das Schwergewicht der Anwendungen eindeutig in diese Richtung verschoben.

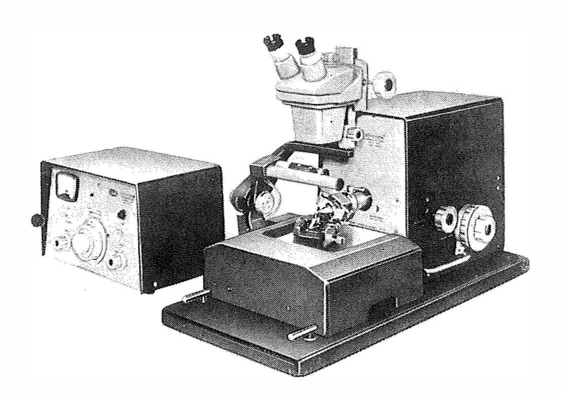


Bild 7.13. Ultramikrotom „Ultratom III" mit Stereo-ZOOM-Mikroskop von Bausch und Lomb
Firma LKB, Schweden, Werkfoto

Bei den heute wesentlich gestiegenen Qualitätsansprüchen lassen sich viele der in diesen Bereichen anfallenden Arbeiten ohne ein solches mikroskopisches Hilfsmittel nicht mehr bewältigen. Es geht hierbei in erster Linie um die Herstellung, Kontrolle und Montage kleiner Teile, z.B. in der Mikroelektronik der Transistoren, Schaltelemente und ganzer Schaltkreise. Der Bedarf an Stereomikroskopen ist deshalb, besonders in diesem Industriezweig, stark angestiegen und wird mit ziemlicher Sicherheit weiter ansteigen.

Auch in der Geologie und Mineralogie wird das Stereomikroskop zur Untersuchung von Gesteinen und Aufbereitungsprodukten im natürlichen und polarisierten Licht in immer stärkerem Maße eingesetzt.

Es war natürlich in diesem Rahmen nicht möglich, alle Anwendungsgebiete anzuführen, es sollten lediglich die wichtigsten herausgegriffen werden, um einen Überblick über die Einsatzmöglichkeiten zu geben.

8. Verfahren zur Wiedergabe mikroskopischer Bilder

von *Gerhard Weidel*

8.1. Einleitung

Das von einem Mikroskop erzeugte Bild kann unserem Sehorgan auf zweierlei Weise zugeführt werden. Im ersten Fall verbinden wir Auge und Mikroskop miteinander, indem wir in das Mikroskop schauen. Es entsteht ein vergrößertes Bild des Gegenstands auf der Netzhaut des Auges. Dieses direkte Verfahren wird als visuelle mikroskopische Beobachtung oder auch als subjektive Mikroskopie bezeichnet. Im anderen Fall wird das vom Mikroskop erzeugte Bild zunächst auf einen Bildträger gebracht – das kann beispielsweise eine fotografische Schicht, die Fotokatode eines Bildübertragungssystems oder ein Projektionsschirm sein – und danach als Bild des mikroskopischen Objekts mit dem Auge betrachtet.
Je nach dem angewendeten Bildwiedergabeverfahren werden die indirekten Beobachtungsmethoden der Mikroskopie als Mikrofotografie, Mikrokinematografie, Mikrokinegrafie, Fernsehmikroskopie, Mikroprojektion oder als Zeichnen des mikroskopischen Bilds bezeichnet.
Anstelle des virtuellen Bilds der visuellen Beobachtung erfordern die Bildwiedergabeverfahren ein reelles Bild in der durch den Ort des Bildträgers gegebenen Entfernung vom Mikroskop.
Mit dem Entstehen des reellen Bilds ist der Vorgang der indirekten Mikroskopie noch nicht abgeschlossen. Das Bild wird vielmehr nachfolgend noch von einem oder mehreren Beobachtern betrachtet. Dabei kommt es darauf an, unter welchem Sehwinkel dann das vom Mikroskop erzeugte Bild gesehen wird, damit alle vom Mikroskop aufgelösten Objektstrukturen auch erkannt werden können. Dieser Tatsache muß von der ersten Phase des Bildwiedergabeverfahrens an Rechnung getragen werden.

8.1.1. Charakteristik der Bildwiedergabeverfahren

8.1.1.1. Mikrofotografie

Aufgabe der Mikrofotografie ist es, das von einem Mikroskop erzeugte Bild des Objekts mit fotografischen Mitteln so aufzunehmen und wiederzugeben, daß bei der Betrachtung des Mikrofotogramms annähernd der gleiche Bildeindruck entsteht wie bei der visuellen mikroskopischen Beobachtung. Das Endbild kann dabei sowohl ein Papierbild, das entweder aus der Bezugssehweite oder als Wandbild auch aus größerer Entfernung betrachtet wird, oder aber ein Diapositiv sein, dessen Betrachtung den Eindruck eines projizierten Bilds des mikroskopischen Objekts vermitteln kann.
Für die Anwendung der Mikrofotografie gibt es keine nennenswerten Einschränkungen, zumal eine Vielzahl verschieden lichtempfindlicher und unterschiedlich sensibilisierter Fotomaterialien zur Verfügung stehen.
Mit der Farbenfotografie ist ohne wesentlichen Mehraufwand eine Bildwiedergabe der Objektfarben möglich.
Die Mikrofotografie ist aber nur in der Lage, Dauerpräparate oder Bewegungsphasen lebender bzw. beweglicher Objekte wiederzugeben.

8.1.1.2. Mikrokinematografie

Die Darstellung von Form- und Strukturänderungen eines mikroskopischen Objekts ist das Haupteinsatzgebiet der Mikrokinematografie.
Durch die Möglichkeit der Veränderung des Zeitmaßstabs – also durch die Anwendung von Zeitdehnung und Zeitraffung – kann die Mikrokinematografie einerseits zur Bewegungsanalyse herangezogen werden, zum anderen gelingt es mit diesem Bildwiedergabeverfahren aber auch, die Bewegungsabläufe darzustellen, die außerhalb des menschlichen Zeitwahrnehmungsvermögens liegen.

8.1.1.3. Mikrokinegrafie

Als Mikrokinegrafie wird das Verfahren der Anfertigung zeitgesteuerter mikrofotografischer Kleinbildaufnahmen zum Zweck der Informationsgewinnung über Objektveränderungen in Abhängigkeit von der Zeit bezeichnet.
Voraussetzung für die Durchführung des Verfahrens ist das Vorhandensein einer mikrofotografischen Kamera mit automatischem Filmtransport und eines Zeitgebers.

8.1.1.4. Fernsehmikroskopie

Unter Fernsehmikroskopie wird die Aufnahme und Wiedergabe des von einem Mikroskop gelieferten Bilds mit fernsehtechnischen Mitteln verstanden.
Durch den Einsatz ultraviolett- oder infrarotempfindlicher Aufnahmebildröhren ermöglicht die Fernsehmikroskopie die mikroskopische Beobachtung in außerhalb der Empfindlichkeit des Auges liegenden Spektralbereichen. Es sei noch erwähnt, daß die durch eine Fernsehkamera erfolgte Umwandlung des mikroskopischen Bilds in elektrische Signale dazu genutzt werden kann, Helligkeitsverteilungen im mikroskopischen Bild zu messen und Objektteile zu zählen.

8.1.1.5. Mikroprojektion

Die Mikroprojektion gelangt in den Fällen zur Anwendung, in denen das Bild des mikroskopischen Objekts unmittelbar einer größeren Anzahl von Beobachtern zugänglich gemacht werden soll. Das Verfahren ist aus lichttechnischen Gründen aber starken Einschränkungen unterworfen. In der Regel können einer größeren Zuschauerzahl nur Durchlicht-Hellfeldbilder dargeboten werden.
Die Objekte sind wegen der notwendigen starken Lichtquelle einer hohen Strahlungsbelastung ausgesetzt. Die Objektbelastung kann beträchtlich vermindert werden, wenn der Abbildungsmaßstab verkleinert und das Projektionsbild mit einem Fernrohr betrachtet wird.

8.1.1.6. Zeichnen eines mikroskopischen Bilds

Die zeichnerische Wiedergabe des von einem Mikroskop erzeugten Bilds ist vor allem in der Ausbildung noch von Bedeutung. Gegenüber den anderen Bildwiedergabeverfahren hat dieses Verfahren zwei wesentliche Vorteile aufzuweisen. Das ist einmal die Möglichkeit, auch die Objekte darzustellen, deren Tiefenausdehnung über die Schärfentiefe der mikroskopischen Abbildung hinausgeht, indem zum Zeichnen die einzelnen Schärfezonen nacheinander scharf eingestellt werden. Zum anderen können zum Zweck einer anschaulicheren Darstellung Bilddetails hervorgehoben oder unterdrückt werden.

8.1.2. Umstellung des zusammengesetzten Mikroskops zur Bildwiedergabe

Alle Bildwiedergabeverfahren erfordern ein reelles Bild des mikroskopischen Objekts auf dem Bildträger. Während bei der visuellen Beobachtung die von einem Objektpunkt ausgehenden Strahlen das Okular parallel zueinander verlassen (*I*, Bild 8.1), müssen diese bei der mikroskopischen

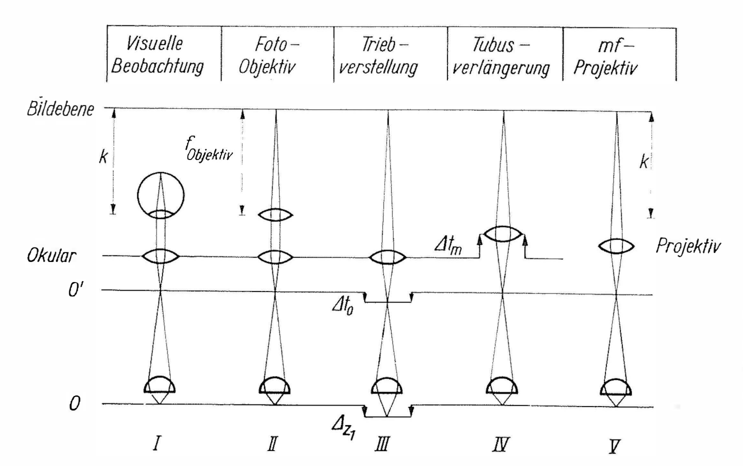


Bild 8.1
Möglichkeiten der Umstellung eines zusammengesetzten Mikroskops zur Bildwiedergabe

Bildwiedergabe in der durch den Bildträger gegebenen Entfernung zum Schnitt gebracht werden. Soll ein Mikroskopokular auch für die Bildwiedergabe eingesetzt werden, können dazu drei Methoden angewendet werden. Durch das auf ∞ eingestellte Fotoobjektiv einer Kamera (*II*, Bild 8.1) kann ein reelles Bild des Objekts in einer der Objektivbrennweite entsprechenden Entfernung erzeugt werden. Diese Anordnung kommt gelegentlich bei der Mikrokinematografie und bei einigen mikrofotografischen Aufsetzkameras zur Anwendung.

Die in der Mikrofotografie mit Geräten variabler Kameralänge sowie beim mikroskopischen Zeichnen überwiegend angewendete Methode der Umstellung eines visuell eingestellten Mikroskops zur Bildwiedergabe besteht in einer Umfokussierung (*III*, Bild 8.1). Man erhält ein reelles Bild des Objekts, wenn man das Mikroskop um den Betrag

$$\Delta z_1 = \frac{f^2_{\text{Okular}}}{M^2_{\text{Objektiv}} k} \qquad (8.1)$$

vom Objekt abhebt. Mit dieser Maßnahme ist aber eine Verkürzung der optischen Tubuslänge und damit das Auftreten eines sphärischen Fehlers verbunden.

Das wird vermieden, wenn die Umstellung des Mikroskops zur Bildwiedergabe durch ein Anheben des Okulars, also durch eine Tubusverlängerung vorgenommen wird, deren Größe

$$\Delta t_m = \frac{f^2_{\text{Okular}}}{k} \qquad (8.2)$$

ist. Bei dieser Art der Umstellung bleibt die Lage des Zwischenbilds erhalten (*IV*, Bild 8.1). Der optisch einwandfreie Weg zur Erzeugung eines reellen Bilds auf dem Bildträger besteht in einem Austausch des Okulars gegen ein Projektiv (*V*, Bild 8.1), das – auf die Verhältnisse der Bildwiedergabe ausgelegt – das Zwischenbild unter Beibehaltung seiner Lage auf dem Bildträger abbildet.

8.2. Mikrofotografie

Makrofotografie und Mikrofotografie unterscheiden sich dadurch, daß bei einer mikrofotografischen Aufnahme das einfache oder das zusammengesetzte Mikroskop anstelle des fotografischen Objektivs eines Fotoapparats tritt. Das die Abbildung des Objekts bewirkende optische System ist bei der Mikrofotografie ein selbständiges optisches Gerät, dessen Handhabung nach eigenen Regeln erfolgt. Das Mikroskop ist von seinem Aufbau her in erster Linie für die visuelle Beobachtung bestimmt, seine Verwendung als Bestandteil einer mikrofotografischen Einrichtung erfolgt aber ohne grundsätzliche Änderung seines optischen Aufbaus.

8.2.1. Einteilung fotografischer Aufnahmen

Nach dem Abbildungsmaßstab ihres Negativs läßt sich jede fotografische Aufnahme der Makrofotografie oder der Mikrofotografie zuordnen. Der Abbildungsmaßstab 1 : 1 kann als eine sinnvolle Grenze der beiden Aufnahmearten angesehen werden. Ist der Negativ-Abbildungsmaßstab kleiner als 1:1, liegt eine Makroaufnahme vor, ist er dagegen größer als 1 : 1, liegt eine Mikroaufnahme vor [552].

Nach der bei der Aufnahme benutzten Geräteanordnung können die fotografischen Aufnahmen noch in Normalaufnahmen, Nahaufnahmen, Lupenaufnahmen und Mikroaufnahmen eingeteilt werden (Tafel 8.1).

Innerhalb der Mikrofotografie kann von der Geräteanordnung her zwischen Lupenaufnahmen und Mikroaufnahmen unterschieden werden, wobei wie folgt definiert wird:

Lupenaufnahme

fotografische Aufnahme mit einem Negativ-Abbildungsmaßstab > 1 : 1, bei der dieser durch ein

Tafel 8.1. Einteilung fotografischer Aufnahmen

Einteilung fotografischer Aufnahmen nach dem Abbildungsmaßstab		nach der gerätemäßigen Anordnung	
$M_{\text{Negativ}} < 1:1$	Makrofotografie	normaler Auszug keine Vorsatzlinse	Normalaufnahme
		Auszugsverlängerung oder Vorsatzlinse	Nahaufnahme
$M_{\text{Negativ}} > 1:1$	Mikrofotografie	einstufige Vergrößerung	Lupenaufnahme
		zweistufige Vergrößerung	Mikroaufnahme

einstufig vergrößerndes optisches System erzielt wird;

Mikroaufnahme

fotografische Aufnahme mit einem Negativ-Abbildungsmaßstab > 1 : 1, bei der dieser durch ein zweistufig vergrößerndes optisches System – durch das zusammengesetzte Mikroskop – erzielt wird.

8.2.2. Aufnahmeformate der Mikrofotografie

Ein weiteres Kennzeichen fotografischer Aufnahmen ist das Aufnahmeformat. Für die Mikrofotografie sind dabei von Bedeutung

Kleinbildformat	24 mm × 36 mm	(24/36)
Mittelformat	65 mm × 90 mm	(6,5/9)
Großformat	90 mm × 120 mm	(9/12)
Großformat	130 mm × 180 mm	(13/18).

Zur vollständigen Bezeichnung einer Aufnahme können die Begriffe Kleinbild-Lupenaufnahme, Kleinbild-Mikroaufnahme, Mittelformat-Lupenaufnahme, Mittelformat-Mikroaufnahme, Großformat-Lupenaufnahme und Großformat-Mikroaufnahme dienen, mit denen eine mikrofotografische Aufnahme dann eindeutig gekennzeichnet ist.

8.2.3. Geräte zur Mikrofotografie

Nach den Kriterien optische Kameralänge und Art der Verbindung von Mikroskop und Kamera können die Geräte zur Mikrofotografie in drei Klassen eingeteilt werden.

8.2.3.1. Aufsetzkamera

Eine mikrofotografische Aufsetzkamera ist durch ihre relativ geringe, aber konstante optische Kameralänge, ihr optisches Einstellsystem und ihre Verwendbarkeit an praktisch allen Mikroskopen bei fester Verbindung von Mikroskop und Kamera gekennzeichnet. Das Hauptaufnahmeformat ist 24 mm × 36 mm.

8.2.3.2. Balgenkamera

Bestimmendes Kennzeichen ist die variable optische Kameralänge. Die optische Achse der Kamera ist meist senkrecht angeordnet. Der Gerätetyp wird dann als Vertikalkamera bezeichnet. Im Normalfall wird das Mikroskop bei mechanischer Trennung von Mikroskop und Kamera unter dieser aufgestellt. Die Balgenkamera kann neben Mikroaufnahmen auch für Lupenaufnahmen benutzt werden. Das Hauptaufnahmeformat ist 9 cm × 12 cm.

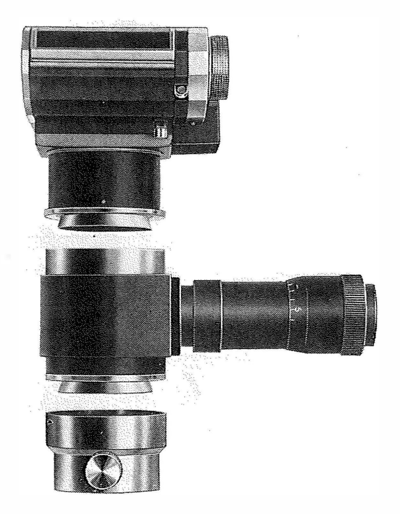
8.2.3.3. Kameramikroskop

Spezielle, für die Mikrofotografie bestimmte Mikroskope werden als Kameramikroskope bezeichnet. Die konstruktive Verschmelzung von Mikroskop und Kamera führt zu einem hohen Bedienungskomfort.
Kleinbild-Kameramikroskope weisen eine konstante optische Kameralänge auf, Großformat-Kameramikroskope werden dagegen meist mit variabler Kameralänge ausgeführt. Schließlich können unter gewissen Voraussetzungen auch durch Fotoansätze ergänzte Mikroskope dieser Klasse zugeordnet werden.

8.2.4. Mikrofotografie mit der Aufsetzkamera

Die Aufsetzkamera kann als die universellste und am vielseitigsten verwendbare mikrofotografische Einrichtung angesehen werden. Wegen ihrer

Bild 8.2. Dreiteilung der Aufsetzkamera in Mikroskopanpassung – Grundkörper – Kameraansatz (v. u. n. o.)



kompakten Bauweise kann sie auf jedes Mikroskop aufgesetzt und damit für jedes Beleuchtungs- und Abbildungsverfahren der Mikroskopie eingesetzt werden.
Ihre Universalität verdankt die Aufsetzkamera ihrer mechanischen Ausbildung, die in der Regel auf einer Dreiteilung der einzelnen Bauelemente beruht (Bild 8.2).
Die mechanische Verbindung von mikrofotografischer Einrichtung und Mikroskop wird mit einer Tubusklemme oder einem Fototubus vorgenommen. Zur Einstellung des Bilds ist die Aufsetzkamera mit einem optischen Einstellsystem versehen, das im Grundkörper untergebracht ist. Der Grundkörper der Aufsetzkamera übernimmt darüber hinaus oft noch weitere Funktionen, z. B. bei der Durchführung einer lichtelektrischen Messung oder einer automatischen Regelung der Belichtungszeit.
Das Aufnahmeformat wird durch den Kameraansatz bestimmt.

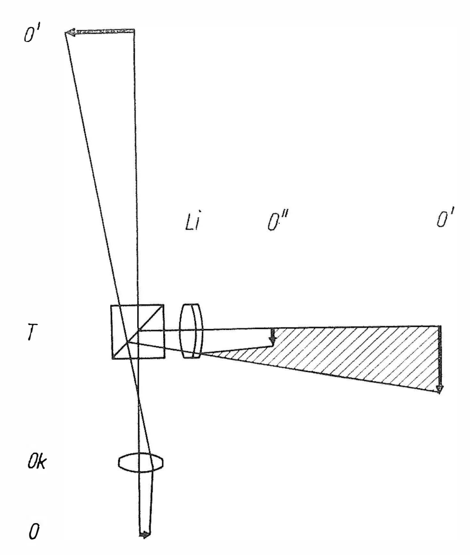


Bild 8.3. Optisches Einstellsystem der Zeiss-Aufsetzkamera mf

8.2.4.1. Optisches Einstellsystem der Aufsetzkamera

Die prinzipielle Funktion des optischen Einstellsystems der Aufsetzkamera ist im Bild 8.3 dargestellt. Durch das Okularsystem *Ok* wird das mikroskopische Zwischenbild, das hier – wie bei allen mikroskopischen Bildwiedergabeverfahren – als Objekt O angesehen werden kann, in die Bildebene O' der Aufsetzkamera abgebildet. Ein Strahlenteiler T lenkt ständig einen Teil des Lichts in das optische Einstellsystem.
Anstelle des Strahlenteilers kann auch ein einschaltbares Umlenkprisma verwendet werden.
Durch ein Linsensystem *Li* wird das der Bildebene der Kamera entsprechende Bild O' der Beobachtungsseite nach O'' zurückverlegt. Am Ort O'' befindet sich eine Klarglasscheibe mit der Formatfigur (Bilder 8.4, 8.5 und 8.7). Mit einem auf eine eventuelle Fehlsichtigkeit des Beobachters einstellbaren Okular wird – wie im Bild 8.5 links ersichtlich – das Bild O'' betrachtet und zusammen mit der Formatfigur gesehen. O' und O'' sind optisch zueinander konjugiert. Das hat zur Folge, daß das Bild in der Bildebene der Aufsetzkamera dann zwangsläufig scharf ist, wenn das Mikroskop bei Beobachtung durch das optische Einstellsystem auf O'' eingestellt wird. Diese Konjugation bleibt auch beim Wechsel des Kameraansatzes erhalten, wenn die Mittelformat- und Großformat-Kameraansätze dieses Typs der Aufsetzkamera entsprechende Bildversetzungslinsen haben (*11*, Bild 8.5, rechts).

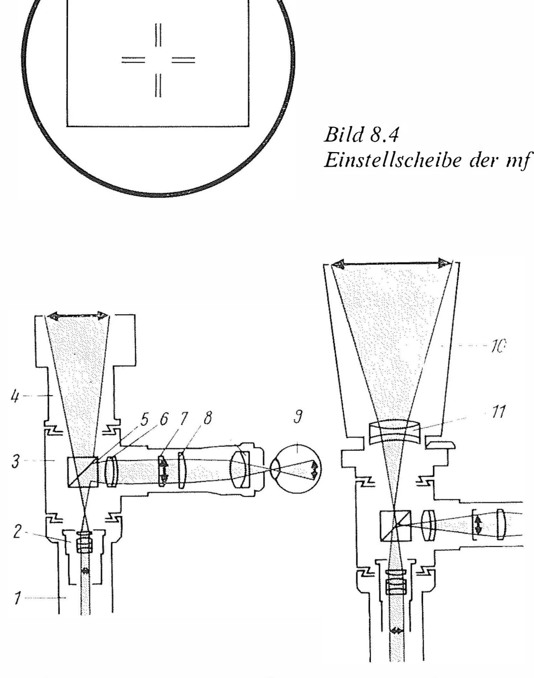


Bild 8.4 Einstellscheibe der mf

Bild 8.5. Optisches Schema der Zeiss-Aufsetzkamera mf
1 mf Tubus; *2 mf*-Projektiv; *3 mf*-Grundkörper; *4 mf*-Kameraansatz; *5* Umlenkelement; *6* Hilfsobjektiv; *7* Einstellscheibe; *8* Einstellokular; *9* Auge; *10 mf*-Kameraansatz; *11* Bildversetzungslinse

8.2.4.2. Umstellung des Mikroskops – Okulare und Projektive

Sollen Mikroskopokulare zur Mikrofotografie mit einer Aufsetzkamera benutzt werden, so ist zu beachten, daß dabei zur Vermeidung eines sphärischen Fehlers bei der Umstellung des Mikroskops von der visuellen Beobachtung zur Mikrofotografie das Okular vom Zwischenbild abgehoben werden muß (s. Abschn. 8.1.2.). Das kann durch eine Tubusverlängerung nach Gl. (8.2) erreicht werden. Bei einer optischen Kameralänge von 125 mm, wie sie bei einer Aufsetzkamera überwiegend zur Anwendung kommt, nimmt diese Tubusverlängerung die in Tafel 8.2 zusammengestellten Werte an.

Tafel 8.2. Tubusverlängerung bei Verwendung von Mikroskopokularen zur Mikrofotografie bei einer optischen Kameralänge von $k = 125$ mm

V_{Okular}	5×	6,3×	8×	10×	12,5×	16×	20×
Δt mm	20	12,5	8	5	3	2	1

Vom VEB Carl Zeiss JENA wurden zur Vermeidung dieser Tubusverlängerung für die Aufsetzkamera „mf" spezielle Systeme herausgebracht, die für die Kameralänge der Aufsetzkamera korrigiert sind und die ihrer Aufgabe – der Projektion des Zwischenbilds als reelles Bild in die Bildebene der Aufsetzkamera – entsprechend als mf-Projektive bezeichnet werden. Zur sicheren Unterscheidung von den Mikroskopokularen werden die mf-Projektive nicht mit ihrer Lupenvergrößerung, sondern mit dem Abbildungsmaßstab gekennzeichnet. Diese Angabe ist auf $k = 125$ mm bezogen.

8.2.4.3. Bestimmung der Belichtungszeit

Die Vielzahl der Beleuchtungs- und Abbildungsverfahren der Mikroskopie einerseits und die unterschiedlichen Transmissions- bzw. Reflexionseigenschaften der mikroskopischen Objekte andererseits haben zur Folge, daß die in der Bildebene einer mikrofotografischen Aufsetzkamera auftretenden Beleuchtungsstärken erheblich voneinander abweichen. Aus dem Helligkeitseindruck des mikroskopischen Bilds kann nur mit großer Unsicherheit auf die zu erwartende Belichtungszeit geschlossen werden.

Beim Arbeiten mit der Aufsetzkamera kann die Belichtungszeit nach den Methoden Belichtungsprobe und Belichtungszeitmessung ermittelt oder durch eine Belichtungsautomatik gesteuert werden.

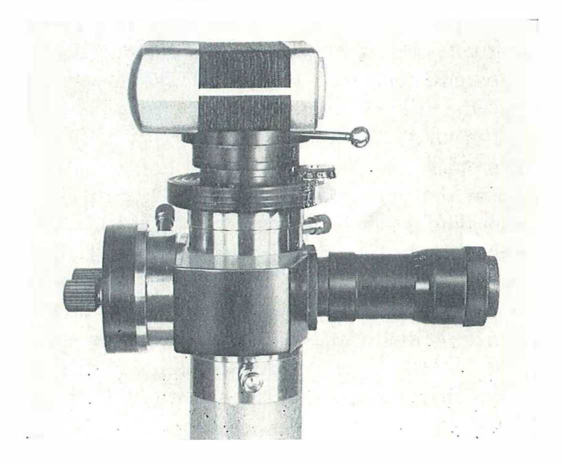
Belichtungsprobe

Bei der Belichtungsprobe wird das Objekt mit einer Reihe von im Verhältnis 1 : 2 gestuften Belichtungszeiten aufgenommen. Bei Mittelformataufnahmen benutzt man dazu die Teilung auf dem Kassettenschieber (s. Abschn. 8.2.5.3.). Bei Kleinbildaufnahmen kann der Zeitaufwand für die Entwicklung und Auswertung der Belichtungsprobe dadurch umgangen werden, das man jede Aufnahme mit einer Belichtungsreihe aufnimmt und beim Negativ/Positivprozeß die richtig belichtete Aufnahme auswählt.

Belichtungszeitmessung

Die aus der allgemeinen Fotografie bekannten Verfahren der lichtelektrischen Messung der Belichtungszeit lassen sich auch auf die Mikrofotografie übertragen. Die Messung sollte dabei in der Bildebene der mikrofotografischen Einrichtung vorgenommen werden. Im Prinzip kann dazu bei der Mikrofotografie mit der Aufsetzkamera der Kameraansatz abgenommen und durch ein in der Bildebene liegendes Selensperrschichtelement ersetzt werden. Bei der praktischen Ausführung (Bild 8.6) wird das Fotoelement in einer zur Bildebene optisch konjugierten Ebene angeordnet (Bilder 8.7 und 8.8). Der vom Fotoelement gelieferte Strom wird mit einem Galvanometer entsprechender Empfindlichkeit gemessen. Aus der Anzeige kann die zugehörige Belichtungszeit einer Eichkurve entnommen werden. Es ist ein Vorteil dieses Verfahrens, daß der Schwarzschild-Exponent des Fotomaterials in die Eichkurve ein-

Bild 8.6. Belichtungszeitmessung an der Aufsetzkamera



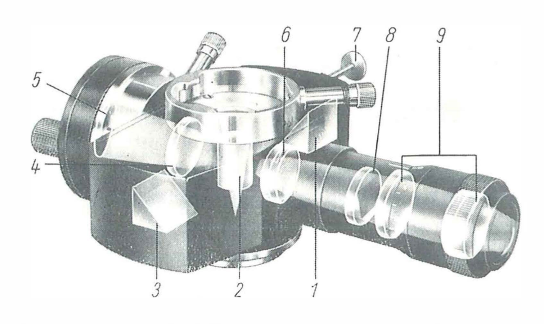


Bild 8.7. Optische Elemente eines mf-Grundkörpers mit Belichtungszeitmessung

1 Umlenkprisma für Beobachtung; *2* optischer Ausgleich für Fotografie; *3* Umlenkprisma für Belichtungszeitmessung; *4* Hilfslinse; *5* Fotoelement; *6* Hilfsobjektiv; *7* Zugstange zur Einstellung von *1*, *2* und *3*; *8* Einstellscheibe; *9* Einstellokular

geht. Die Methode erfordert aber ein relativ hochempfindliches Meßinstrument.

Durch den Einsatz von Fotowiderständen in modernen Taschenbelichtungsmessern wurde eine beträchtliche Empfindlichkeitssteigerung erzielt. Das kommt der Verwendung derartiger Belichtungsmesser in der Mikrofotografie entgegen. Der zu diesem Zweck in ein „Meßauge" eingebaute Fotowiderstand kann u.a. auch an den Grundkörper einer Aufsetzkamera angesetzt (Bild 8.9) oder in diesen eingebaut werden. Bei einer solchen Belichtungsmessermodifikation erhält die Blendenwertskale die Funktion einer Eichwertskale.

Wird eine Aufsetzkamera nur für ein Aufnahmeformat ausgelegt, kann die manuelle Übertragung des Meßergebnisses auf den Verschluß automati-

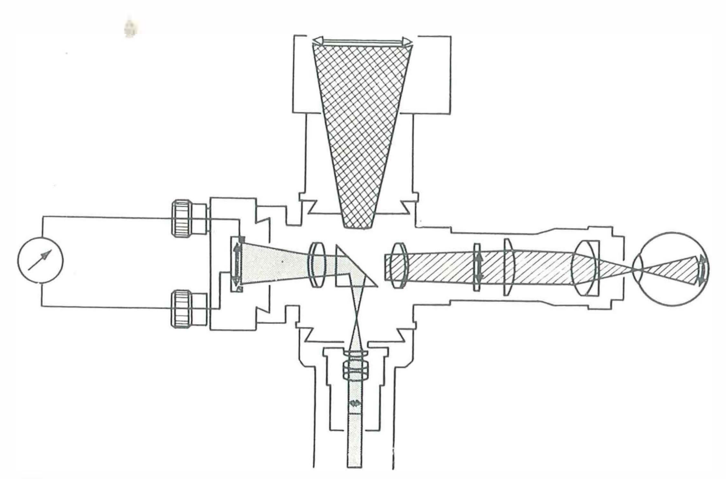
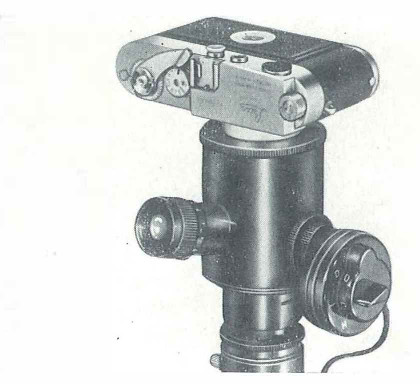
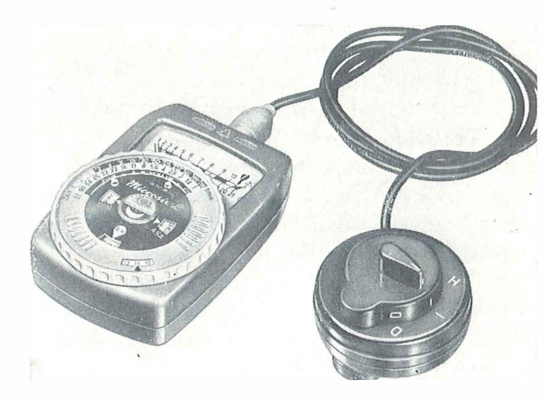


Bild 8.8. Schema der mf-Belichtungszeitmessung

Bild 8.9. Modifikation eines Taschenbelichtungsmessers zur Belichtungszeitmessung bei mikrofotografischen Aufnahmen

Belichtungsmesser MICROSIX-L, Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto





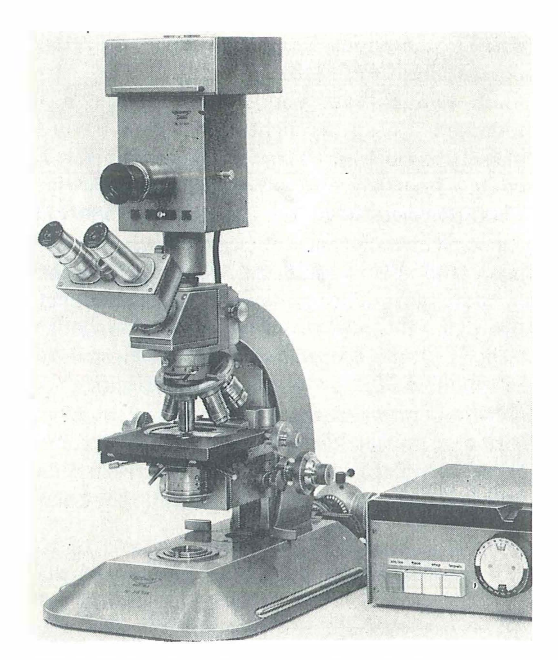


Bild 8.10. Reichert-Fotoautomatik auf Mikroskop ZETOPAN
Firma C. Reichert, Wien, Werkfoto

siert werden. Allerdings sind dann Korrekturen für den Schwarzschild-Effekt erforderlich. Ein solches Gerät ist die Reichert-Fotoautomatik (Bild 8.10). Vor der Aufnahme wird die Belichtungszeit gemessen, das Meßergebnis wird als Belichtungszeit angezeigt und auf den Verschluß übertragen.

Belichtungsautomatik

Für eine vollautomatische Steuerung der Belichtungszeit sind bei der Mikrofotografie mit einer Aufsetzkamera spezielle elektromagnetische Verschlüsse erforderlich. Ein solcher Verschluß wurde z. B. von *Illgen* [548] angegeben und wird in der Belichtungsautomatik des VEB Carl Zeiss JENA angewendet, deren schematischen Aufbau Bild 8.11 zeigt.
Der Verschluß ist oberhalb des Strahlenteilers für das optische Einstellsystem angeordnet. Zur Steuerung der Belichtung ist oberhalb des Verschlusses ein weiterer Strahlenteiler angeordnet, der während der Belichtung einen Teil des Lichts zum Lichtfühler der Automatik lenkt.
Zur Steuerung der Belichtungszeit wird ein zentraler Bildausschnitt herangezogen und die Belichtung so auf die bildwichtigen Details zugeschnitten. Diese Maßnahme erübrigt eine Umschaltung der Automatik auf die sog. *Punktmessung*, die erforderlich wird, wenn zur Steuerung der Belichtung das gesamte Sehfeld oder ein außerhalb des Aufnahmeformats liegender Bildanteil benutzt wird.
Die Lichtübertragung von der Aufsetzkamera zum Lichtfühler erfolgt über ein Lichtleitkabel. Im Bild 8.12 wird ein Geräteaufbau zur Kleinbild-Mikrofotografie mit Belichtungsautomatik ge-

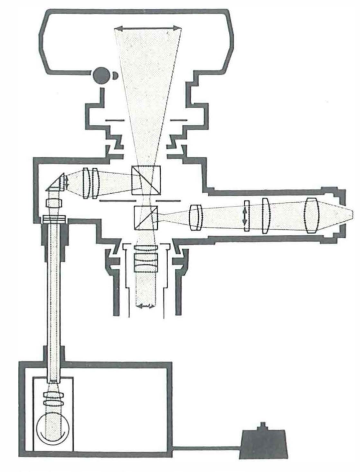
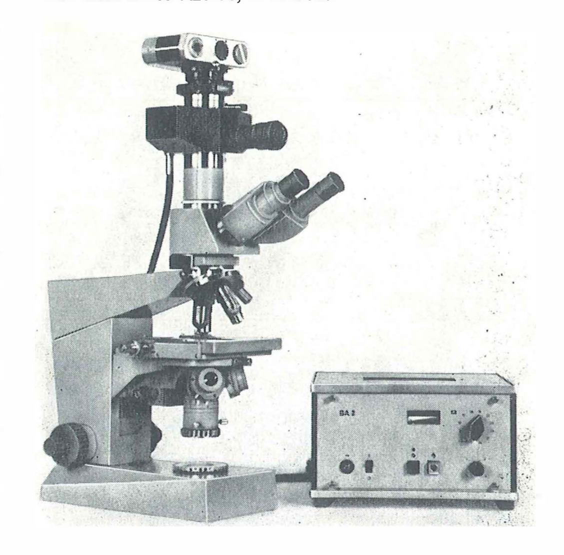


Bild 8.11. Optisches Schema der Zeiss-Belichtungsautomatik mf · matic

Bild 8.12. Geräteaufbau zur Anfertigung von Kleinbild-Mikroaufnahmen mit automatischer Steuerung der Belichtungszeit
Forschungsmikroskop AMPLIVAL mit Wechseltubus und Belichtungsautomatik *mf* · matic
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

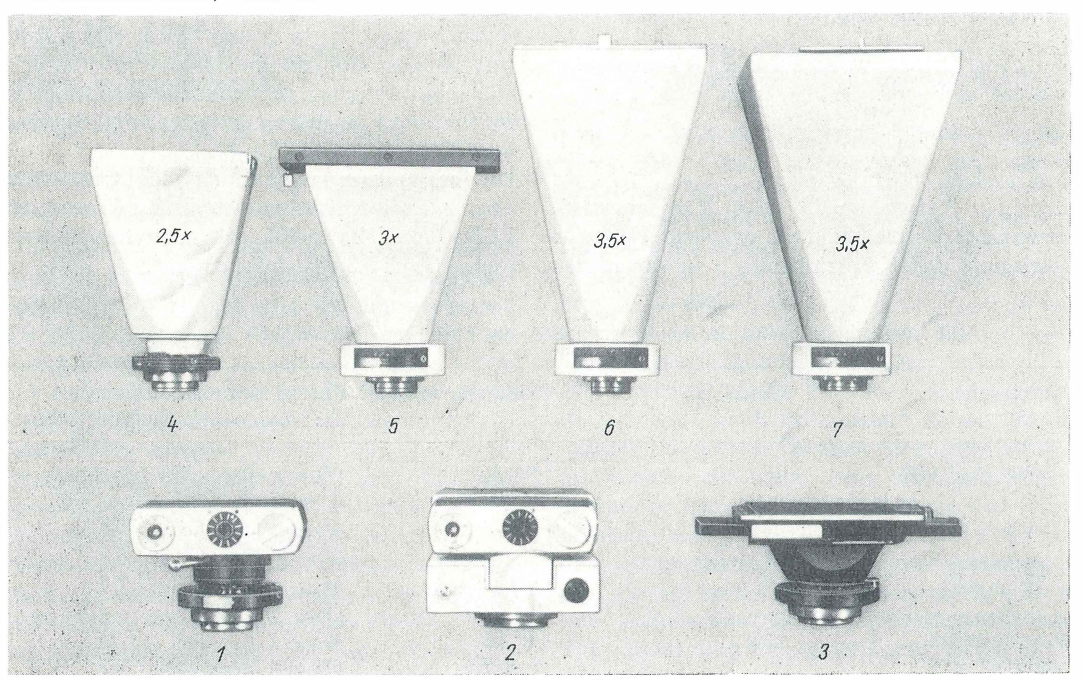


zeigt. Das Schaltgerät dieser Belichtungsautomatik ist mit einer Anzeige des bereits abgelaufenen bzw. des noch bevorstehenden Anteils der Belichtungszeit ausgerüstet – eine Anzeige, die besonders beim Auftreten langer Belichtungszeiten von Vorteil ist.
Die Farbenempfindlichkeit des Lichtfühlers einer Belichtungsautomatik weicht meist von der eines panchromatischen Fotomaterials ab.
Man kann das durch ein vor dem Lichtfühler angeordnetes Lichtfilter zwar verbessern, eine vollständige Angleichung ist aber in den seltensten Fällen möglich. Erfordern mikrofotografische Aufnahmen ein strenges Blau- oder Rotfilter, dann sollte man mit einer Stoppuhr die Schaltzeit der Automatik ohne dieses Filter messen und danach mit Filter eine dessen Verlängerungsfaktor entsprechende Zeit durch Handsteuerung der Automatik belichten.
Auch ist eine Belichtungsautomatik nicht in der Lage, die durch den Schwarzschild-Effekt bedingte Verlängerung der Belichtungszeit bei lichtschwachen mikroskopischen Beleuchtungsverfahren zu kompensieren. Ein einfaches Hilfsmittel besteht darin, die Belichtungsautomatik stets unter Anwendung des vorgesehenen mikroskopischen Beleuchtungsverfahrens zu eichen. Es kann davon ausgegangen werden, daß innerhalb eines Belichtungszeitenbereichs von etwa 1 : 100 die durch den Schwarzschild-Effekt bedingte Belichtungszeitverlängerung unerheblich ist. Innerhalb der einzelnen Beleuchtungsverfahren der Mikroskopie streuen die Belichtungszeiten mikrofotografischer Aufnahmen selten über diesen Umfang hinaus, so daß eine für das zutreffende Beleuchtungsverfahren durchgeführte Automatikeichung dann keine weiteren Korrekturen mehr erfordert.

8.2.4.4. Aufnahmeformat

Ein weiteres typisches Merkmal der Aufsetzkamera ist die leicht zu bewerkstelligende Variation des Aufnahmeformats. Zwar herrscht das Kleinbildformat 24 mm × 36 mm vor, doch hat eine Reihe von Gründen dazu geführt, die Aufsetzkamera auch für die Mittel- und Großformatmikrofotografie einzurichten. Dem kommt die genannte Dreiteilung in der mechanischen Ausbildung der Aufsetzkamera entgegen – der Übergang von einem Aufnahmeformat zum anderen geschieht durch Auswechselung des Kameraansatzes.
Die Variationsbreite einer Aufsetzkamera hinsichtlich ihrer Ausbaufähigkeit für die verschiedenen Aufnahmeverfahren zeigt Bild 8.13. Inner-

Bild 8.13. Kameraansätze der Aufsetzkamera Zmf-Kameraansätze und -Adapter
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



halb des als Beispiel gewählten Baukastensystems der mikrofotografischen Einrichtung mf des VEB Carl Zeiss JENA stehen Kameraansätze für Kleinbildaufnahmen mit manuellem *1* oder mit automatischem Filmtransport *2*, für Kleinbildaufnahmen auf Fotoplatte 6,5 cm × 9 cm *3*, für Mittelformataufnahmen 6,5 cm × 9 cm *4*, für Großformataufnahmen 9 cm × 12 cm *6* sowie Adapter für Polaroidkassetten *5* bzw. -filmhalter *7* zur Wahl. Darüber hinaus können noch handelsübliche Kleinbildkameras durch ein entsprechendes Ansetzstück in das System dieser Aufsetzkamera einbezogen werden.
Durch den Einbau entsprechender Bildversetzungslinsen (*11*, Bild 8.5) in die Mittel- und Großformat-Kameraansätze bzw. -Adapter wurde erreicht, daß stets ein dem Kleinbildformat entsprechender Bildausschnitt erfaßt wird. Auf diese Weise hat die Formatfigur (Bild 8.4) im optischen Einstellsystem für alle Formate der Aufsetzkamera Gültigkeit. Auch bedarf es beim Wechsel des Aufnahmeformats – gleichen Endbild-Abbildungsmaßstab vorausgesetzt – keiner Veränderung der Objektiv-Projektiv-Kombination.

8.2.4.5. Abbildungsmaßstab der Aufnahme

Der Abbildungsmaßstab des Negativs einer mikrofotografischen Aufnahme kann nach

$$M_{\text{Negativ}} = V_{\text{Mikroskop}} \frac{k}{250} \qquad (8.3)$$

berechnet werden, wobei $k/250$ als Kamerafaktor p bezeichnet wird. Gl. (8.3) kann deshalb auch

$$M_{\text{Negativ}} = M_{\text{Objektiv}}\, V_{\text{Okular}}\, p \qquad (8.4)$$

geschrieben werden.
Bei einer Aufsetzkamera, deren Kameraansätze gewechselt werden können, empfiehlt sich eine Zerlegung des Kamerafaktors p in die beiden Glieder $p_{\text{Aufsetzkamera}}$ und $p_{\text{Kameraansatz}}$. In Gl. (8.4) eingesetzt, ergibt sich dann

$$M_{\text{Negativ}} = M_{\text{Objektiv}} V_{\text{Okular}} p_{\text{Aufsetzkamera}} p_{\text{Kameraansatz}}. \qquad (8.5)$$

Das mag auf den ersten Blick umständlich und unbequem erscheinen. Wenn – wie im Fall der Zeiss-Aufsetzkamera mf – das Okularsystem des Mikroskops nicht nur auf die Kameralänge der Aufsetzkamera optisch korrigiert, sondern darüber hinaus noch mit dem Maßstab gekennzeichnet ist, den es in Verbindung mit der Aufsetzkamera ergibt, wenn also

$$M_{\text{Projektiv}} = V_{\text{Okular}} p_{\text{Aufsetzkamera}} \qquad (8.6)$$

ist, wird aus Gl. (8.5)

$$M_{\text{Negativ}} = M_{\text{Objektiv}} M_{\text{Proj}} p_{\text{Kameraansatz}}. \qquad (8.7)$$

Beim Arbeiten mit mf-Projektiven ist die Angabe eines nach Gl. (8.7) errechneten Abbildungsmaßstabs für die mikrofotografische Praxis ausreichend genau. Werden Okulare in Verbindung mit der Aufsetzkamera benutzt, dann liefert Gl. (8.5) deshalb nur einen Näherungswert, weil $p_{\text{Aufsetzkamera}}$ wegen der mechanischen Ausbildung der Aufsetzkamera für jedes Okular einen anderen Wert annimmt, wenn die Aufsetzkamera „nach Vorschrift" mit der Tubusklemme so mit dem Mikroskop verbunden wird, daß Tubusklemmenoberkante und Okulardeckel auf gleiche Höhe kommen. Ist in diesen Fällen eine genaue Angabe des Abbildungsmaßstabs erforderlich, muß eine Messung des Abbildungsmaßstabs in der Bildebene des Kameraansatzes vorgenommen werden (s. Abschnitt 8.2.5.4.).
Die für die Errechnung des Abbildungsmaßstabs einer Aufnahme mit der Aufsetzkamera mf des VEB Carl Zeiss JENA geltenden Beziehungen sind in Tafel 8.3 zusammengestellt.

Tafel 8.3. Die Abbildungsmaßstäbe der mf-Aufsetzkamera des VEB Carl Zeiss JENA

Kameraansatz	$p_{\text{Kameraansatz}}$	Okularsystem	Formel für die Errechnung des Negativ-Abbildungsmaßstabs
24 mm × 36 mm	1×	Okular	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, V_{\text{Ok}}\ 0{,}5$
		Projektiv	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, M_{\text{Proj}}$
6,5 cm × 9 cm	2,5×	Okular	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, V_{\text{Ok}}\ 1{,}25$
		Projektiv	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, M_{\text{Proj}}\ 2{,}5$
P $3\frac{1}{4}'' \times 4\frac{1}{4}''$	3×	Okular	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, V_{\text{Ok}}\ 1{,}5$
		Projektiv	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, M_{\text{Proj}}\ 3$
9 cm × 12 cm und P 4″ × 5″	3,5×	Okular	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, V_{\text{Ok}}\ 1{,}75$
		Projektiv	$M_{\text{Neg}} = M_{\text{Obj}}\, M_{\text{Proj}}\ 3{,}5$

Wegen des kleinen Aufnahmeformats muß bei der Mikrofotografie mit einer Aufsetzkamera stets davon ausgegangen werden, daß das Negativ der Aufnahme im fotografischen Negativ/Positivprozeß nochmals vergrößert wird. Diese nachfolgende Vergrößerung muß bereits bei der Wahl des Abbildungsmaßstabs der Kleinbild- oder Mittelformataufnahme berücksichtigt werden.
So wie bei der visuellen mikroskopischen Beobachtung die Wahl der Vergrößerung des Mikroskops der Regel der „förderlichen Vergrößerung" genügen muß, gilt diese Regel auch für die Betrachtung des Endbilds eines mikroskopischen Bildwiedergabeverfahrens. Während das mikroskopische Bild bei visueller Beobachtung stets als in der Bezugssehweite liegend angenommen wird, kann das Endbild eines mikroskopischen Bildwiedergabeverfahrens durchaus aus einer anderen – meist größeren – Entfernung betrachtet werden. Die Betrachtungsentfernung muß bei der Wahl des Abbildungsmaßstabs für das Endbild berücksichtigt werden. Für den „förderlichen Abbildungsmaßstab"des Endbilds gilt die Beziehung

$$500\, A_{\mathrm{Obj}} \frac{w}{250} \leqq M_{\mathrm{förderlich}} \leqq 1000\, A_{\mathrm{Obj}} \frac{w}{250}; \tag{8.8}$$

w = Betrachtungsabstand des Endbilds in mm.

Wird ein Mikrofotogramm aus der Bezugssehweite 250 mm betrachtet, dann sind die Werte für die „förderliche Vergrößerung" und den „förderlichen Abbildungsmaßstab" zahlenmäßig gleich, weil dann der Quotient $w/250$ den Wert 1 annimmt. In diesem Fall gilt

$$500\, A_{\mathrm{Obj}} \leqq M_{\mathrm{förderlich}} \leqq 1000\, A_{\mathrm{Obj}}. \tag{8.9}$$

8.2.4.6. Lupenfotografie mit der Aufsetzkamera

Die einstufig vergrößerte Abbildung des Objekts wird vor allem für Übersichtsdarstellungen angewendet. Zur Kleinbild- und Mittelformat-Lupenfotografie können die Kameraansätze einer Aufsetzkamera dann verwendet werden, wenn einmal die Aufsetzkamera nach dem Dreiteilungsprinzip (Bild 8.2) aufgebaut ist und zum anderen die Verbindung der einzelnen Bauteile mit der gleichen Wechselvorrichtung erfolgt, die auch zum Aufsetzen der Beobachtungstuben auf das Mikroskop zur Anwendung gelangt (Bild 8.14).
Zur Beleuchtung des Objekts sind Lupenkondensoren, zur Abbildung lupenfotografische Objektive erforderlich. Die Beleuchtung des Objekts weicht bei Lupenaufnahmen von der Regel des Köhlerschen Beleuchtungsverfahrens insofern ab, als die Leuchtfeldblende nicht in das Präparat, sondern in die Öffnungsblende des Lupenobjektivs abgebildet wird.

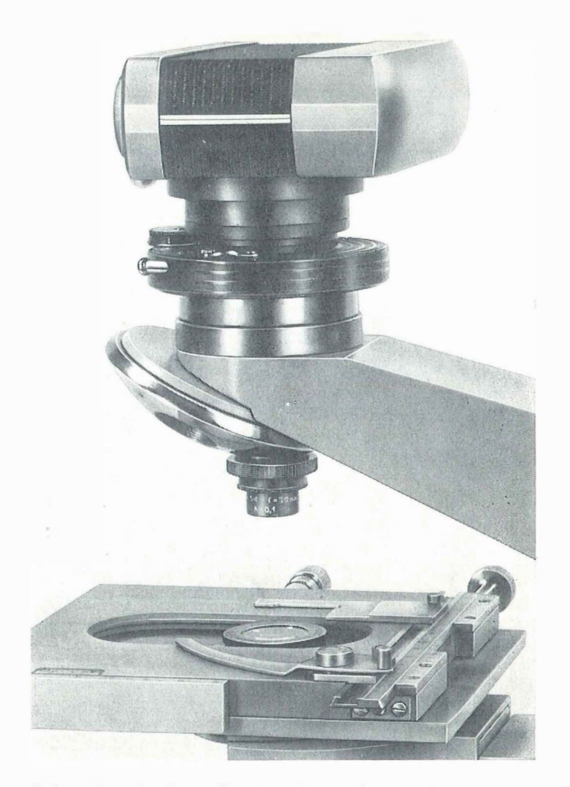


Bild 8.14. Geräteaufbau zur Lupenfotografie mit Teilen der Aufsetzkamera mf
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Der Abbildungsmaßstab einer lupenfotografischen Aufnahme, aufgenommen mit einem System der Brennweite f bei einem Brennpunktabstand des Bilds k – der optischen Kameralänge –, kann nach der Gleichung

$$M_{\mathrm{Negativ}} = k/f \tag{8.10}$$

überschlagsmäßig errechnet werden.
Bei Lupenaufnahmen ist eine lichtelektrische Bestimmung der Belichtungszeit in der Weise möglich, daß man ein Fotoelement in die Bildebene der Einrichtung bringt. Aus dem gemessenen Fotostrom kann die Belichtungszeit über eine Eichkurve ermittelt werden.
Eine vollautomatische Regelung der Belichtungszeit erfordert bei einstufig vergrößerter Abbildung eine spezielle, nur für diese Aufnahmen verwendbare Anordnung mit einem kaum vertretbaren

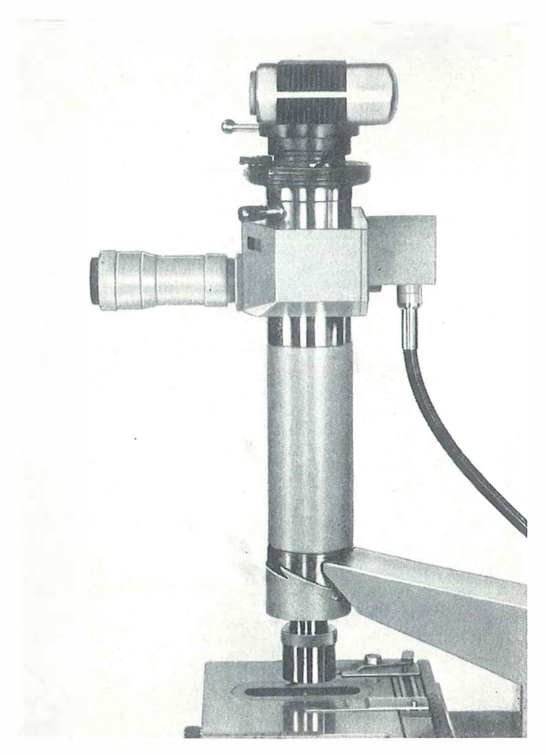


Bild 8.15. Geräteaufbau zur Mikrofotografie

Aufnahme von Übersichtsbildern mit Planachromat 1/0,03, Mikroskop ERGAVAL, Aufsetzkamera mf

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Aufwand. Zur automatischen Steuerung der Belichtungszeit bei Übersichtsaufnahmen wird deshalb eine zweistufig vergrößernde Anordnung bevorzugt und als Objektiv ein Mikroskopobjektiv der Maßstabszahl 1 benutzt. Dieses ermöglicht den Einsatz einer mikrofotografischen Belichtungsautomatik ohne Änderungen des Geräts auch zur vollautomatischen Regelung der Belichtungszeit bei den Abbildungsmaßstäben, die gemeinhin als der Lupenfotografie vorbehalten angesehen werden. Unter diesem Aspekt verliert die einstufig vergrößernde Abbildung des Objekts mit lupenfotografischen Objektiven bei Kleinbild- und Mittelformataufnahmen dann an Bedeutung, wenn es allein um die Anfertigung von Übersichtsbildern geht (Bild 8.15).

8.2.5. Mikrofotografie mit der Balgenkamera

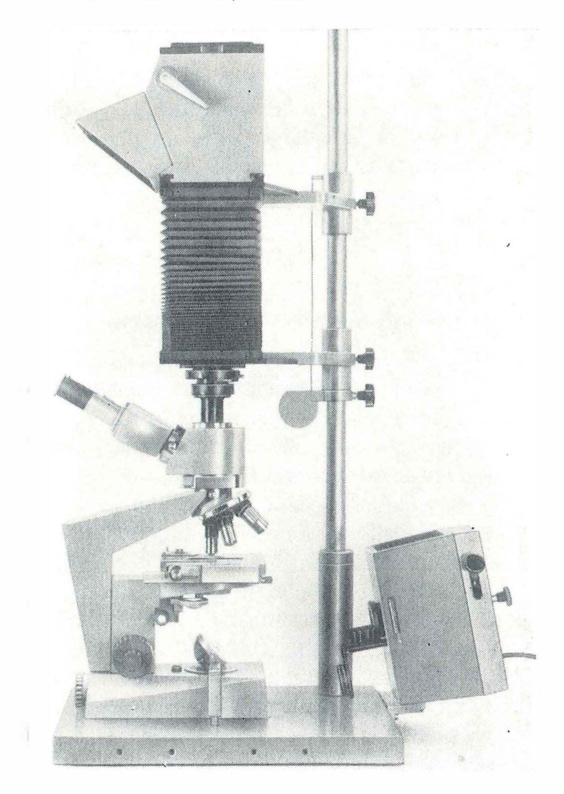
Das wesentliche Kennzeichen der Balgenkamera ist die Veränderlichkeit der optischen Kameralänge. Überwiegend sind Balgenkameras für mikrofotografische Zwecke auf das Großformat 9 cm × 12 cm oder 4″ × 5″ ausgelegt, wobei die vertikale Anordnung vorherrscht.
Der Aufbau einer Balgenkamera für die Mikrofotografie wird im Bild 8.16 am Beispiel der mikrofotografischen Einrichtung *st* des VEB Carl Zeiss JENA gezeigt.
Grundsätzlich ist es möglich, die im Mikroskopfuß vieler Durchlichtmikroskope eingebaute Lichtquelle auch zur Großformat-Mikrofotografie einzusetzen. Das führt aber zu Schwierigkeiten bei der Einstellung des Bilds und zu langen Belichtungszeiten. Deshalb werden zur Großformatmikrofotografie stärkere Lichtquellen bevorzugt.

8.2.5.1. Einstellung des Bilds

Die Einstellung des Bilds erfolgt bei der Balgenkamera auf einer Einstellscheibe in der Bildebene der mikrofotografischen Einrichtung. Zur Er-

Bild 8.16. Balgenkamera für Großformat-Mikroaufnahmen ERGAVAL-st

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



leichterung dieser Einstellung – vor allem bei großen Kameralängen – werden die mikrofotografischen Balgenkameras mit einem Spiegelreflexaufsatz ausgerüstet. Für die jeder mikrofotografischen Aufnahme vorausgehende visuelle Einstellung des Mikroskops dienen spezielle Fototuben.

8.2.5.2. Umstellung des Mikroskops

Zur Mikrofotografie werden an der Balgenkamera die üblichen Mikroskopokulare benutzt. Bei kurzen Kameralängen und schwachen Okularen ist eine Tubusverlängerung nach Gl. (8.2) (Abschnitt 8.1.2.) erforderlich, deren Werte Tafel 8.4 entnommen werden können.

Tafel 8.4. Tubusverlängerung in mm bei Verwendung von Mikroskopokularen zur Mikrofotografie mit einer Balgenkamera

k \ V_{Okular}	6,3×	8×	10×	12,5×	16×	20×
200 mm	8	5	3	2	1	0,5
400 mm	4	2,5	1,5	1	0,5	–
600 mm	2,5	1,5	1	0,5	–	–

8.2.5.3. Bestimmung der Belichtungszeit

Die Bestimmung der Belichtungszeit erfolgt beim Arbeiten mit einer mikrofotografischen Balgenkamera nach den gleichen Methoden wie bei der Aufsetzkamera: Probebelichtung – lichtelektrische Messung – Belichtungsautomatik.

Belichtungsprobe

Eine Belichtungsprobe kann im einfachsten Fall mit der zur Balgenkamera gehörenden Plattenkassette angefertigt werden, deren Kassettenschieber dazu mit einer Teilung (Bild 8.17) versehen ist.

Die Probe wird so ausgeführt, daß zunächst der Kassettenschieber so weit herausgezogen wird, daß die gesamte Teilung sichtbar ist. Die Mittelfelder der Teilung geben die zu jedem Teilstreifen der Belichtungsprobe auszuführende Einzelbelichtungszeit an. Als erstes wird das gesamte Negativ mit 1 oder 1/100 s belichtet. Diese Entscheidung kann nach dem Helligkeitseindruck des Bilds relativ leicht getroffen werden.

Dann wird der Kassettenschieber um eine Streifenbreite bis zum nächsten Teilstrich eingeschoben

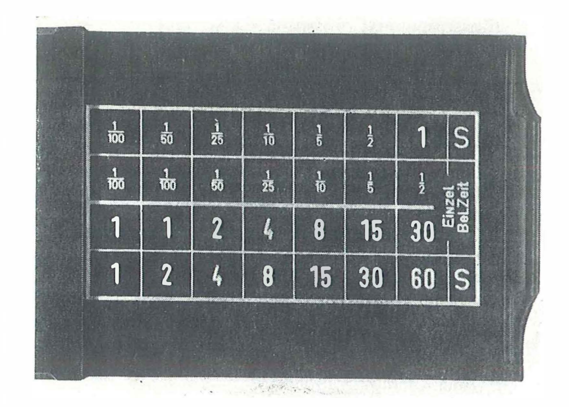


Bild 8.17. Teilung auf dem Kassettenschieber zur Anfertigung einer Belichtungsprobe

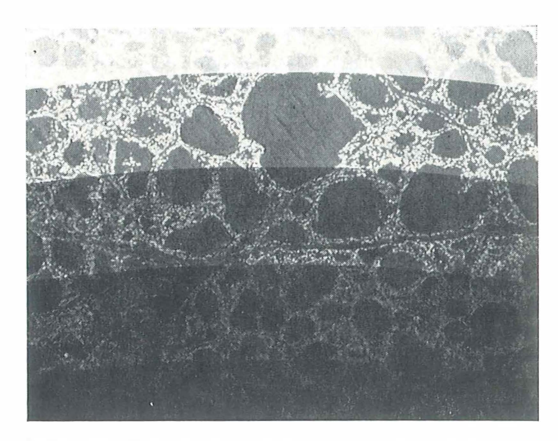


Bild 8.18. Beispiel einer Belichtungsprobe mit dem Kassettenschieber (Negativ)

Tafel 8.5. Einzel- und Streifenbelichtungszeiten in Sekunden bei der Belichtungsprobe mit dem Kassettenschieber

Streifen-Nr.	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V*	*VI*	*VII*
1. Belichtung	1	1	1	1	1	1	1
2. Belichtung	–	1	1	1	1	1	1
3. Belichtung	–	–	2	2	2	2	2
4. Belichtung	–	–	–	4	4	4	4
5. Belichtung	–	–	–	–	8	8	8
6. Belichtung	–	–	–	–	–	15	15
7. Belichtung	–	–	–	–	–	–	30
Streifenbelichtungszeit in s	1	2	4	8	15	30	60

und die erste Belichtungszeit wiederholt. Vom folgenden Streifen an wird die Belichtungszeit dann jeweils verdoppelt.
Im Bild 8.18 ist eine nach diesem Verfahren angefertigte Belichtungsprobe dargestellt. Das Zustandekommen der Streifenbelichtungszeiten für die Erstbelichtungszeit 1 s ist in Tafel 8.5 ersichtlich.
Eine nach der vorstehend beschriebenen Methode durchgeführte Belichtungsprobe setzt voraus, daß sich die Objektstruktur annähernd gleichmäßig über das gesamte Bildfeld verteilt.

Belichtungszeitmessung

Die lichtelektrische Messung der Belichtungszeit mit einer mikrofotografischen Balgenkamera wird gelegentlich mit einer Okularfotozelle vorgenommen, die auf der Beobachtungsseite des Fototubus – etwa in der Zwischenbildebene des Mikroskops – angeordnet wird. Aus dem Meßwert kann auf die erforderliche Belichtungszeit geschlossen werden, indem die Ablesung mit einem von der Okularvergrößerung auf der Fotoseite und der Kameralänge abhängigen Faktor umgewandelt wird.
Bei genügend hellen Bildern kann die Bildhelligkeit mit einem ausreichend empfindlichen Belichtungsmesser auf der Einstellscheibe gemessen werden. Man erhält über einen empirisch zu bestimmenden Umwandlungsfaktor brauchbare Ergebnisse.

Belichtungsautomatik

Jede vollautomatische Regelung der Belichtungszeit erfordert den gleichzeitigen Lichteinfall auf Fotoschicht und Lichtfühler. Bei der Balgenkamera stehen für die Lichtführung zum Lichtfühler zwei Wege zur Wahl, die im Bild 8.19 schematisch dargestellt sind.
Man kann einmal einen Teil des Lichts in der Form zum Lichtfühler abzweigen, daß man – wie bei der Aufsetzkamera – oberhalb des Okulars einen Strahlenteiler einbaut, zum anderen kann der Lichtfühler in der Bildebene außerhalb des Bildformats angeordnet werden.
Das erstgenannte Verfahren hat den Vorteil, zur Belichtungssteuerung einen zentralen Bildausschnitt zu verwenden. Dabei muß aber wegen des konstanten Abstands des Lichtfühlers und der variablen Kameralänge eine Korrektur der Automatik auf die Kameralänge vorgenommen werden.
Das zweite Verfahren erfordert diese Korrektur nicht, legt der Belichtungssteuerung aber einen

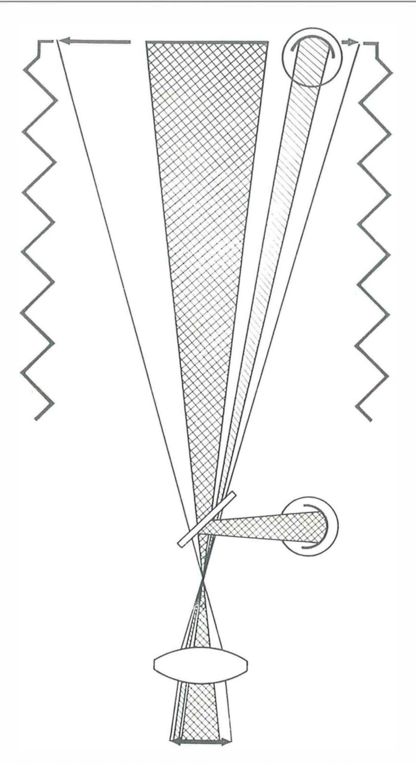


Bild 8.19. Möglichkeiten der Anordnung des Lichtfühlers für eine Belichtungsautomatik an der Balgenkamera

Objektanteil zugrunde, der für die Aufnahme nicht verwendet wird.
Beide Arten einer Belichtungsautomatik für die mikrofotografische Balgenkamera sind ausgeführt worden.
Die st-Belichtungsautomatik des VEB Carl Zeiss JENA arbeitet nach dem ersten, die Belichtungsautomatik für die Balgenkamera von Leitz, Wetzlar (BRD) (Bild 8.20) benutzt das zweite Verfahren.

8.2.5.4. Abbildungsmaßstab der Aufnahme

Errechnung des Abbildungsmaßstabs

Auch beim Arbeiten mit einer Balgenkamera kann der Abbildungsmaßstab des Negativs der mikrofotografischen Aufnahme nach Gl. (8.3) errechnet werden. Die Balgenkamera ist dazu meist mit einem Bandmaß zum Messen der optischen Kameralänge k versehen.
Hinsichtlich der Genauigkeit der so ermittelten Werte muß beachtet werden, daß die auf den Mikroskopobjektiven und -okularen angegebe-

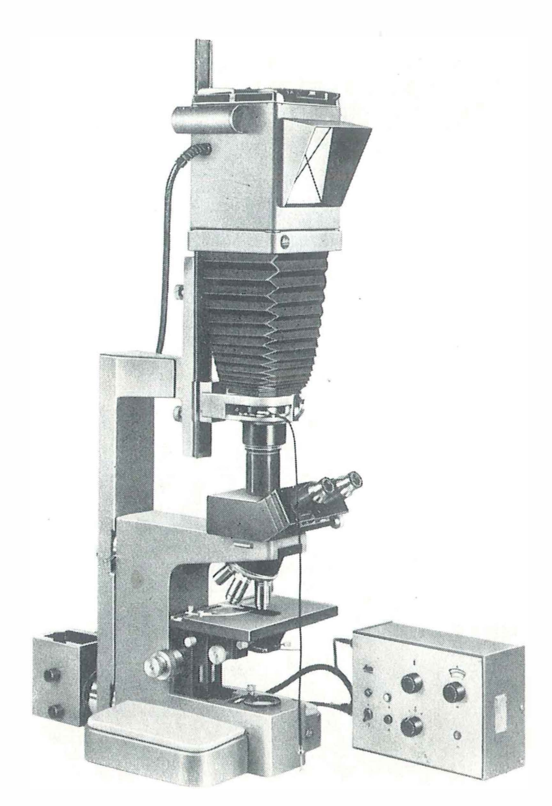


Bild 8.20. Leitz-Belichtungsautomatik für die Balgenkamera
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

nen Werte der Objektiv-Maßstabszahl und der Okular-Lupenvergrößerung vom angegebenen Wert um $\pm$ 5% abweichen können und daß ferner die Messung der optischen Kameralänge, wenn sie – wie in der Praxis üblich – vom Okulardeckel gemessen wird, ebenfalls vom genauen Wert abweicht.

Bestimmung des Abbildungsmaßstabs durch Messung des Objekt/Bildabstands

Als Objekt/Bildabstand wird in diesem Fall die Entfernung der Bildebene der mikrofotografischen Einrichtung vom Objekttisch des Mikroskops verstanden. Dieser Abstand kann mit einem auf den Objekttisch des Mikroskops gestellten Maßstab ohne Veränderung der Einstellung der Einrichtung gemessen werden. Der Abbildungsmaßstab kann auch in Abhängigkeit vom Objekt/Bildabstand in der im Bild 8.21 gezeigten Weise für den zur Mikrofotografie benutzten Objektivsatz in Verbindung mit einem oder mehreren Okularen grafisch dargestellt werden. Mit einer solchen Darstellung kann nicht nur der Abbildungsmaßstab der Aufnahme in einer für die Praxis ausreichenden Genauigkeit bestimmt, sondern darüber hinaus auch die mikrofotografische Einrichtung vor der Aufnahme auf einen gewünschten Abbildungsmaßstab eingestellt werden.
In die Darstellung der Abhängigkeit des Abbildungsmaßstabs vom Objekt/Bildabstand kann außerdem noch der Bereich des „förderlichen Abbildungsmaßstabs" für eine aus der Bezugssehweite vorgenommene Bildbetrachtung des im Kontaktverfahren gewonnenen Positivbilds eingezeichnet werden (Bereich zwischen den gestrichelten Linien im Bild 8.21).

Messung des Abbildungsmaßstabs

Die genaue Bestimmung des Abbildungsmaßstabs geschieht durch eine Messung des Bilds der Teilung einer Objektmeßplatte auf der Einstellscheibe in der Bildebene der mikrofotografischen Einrich-

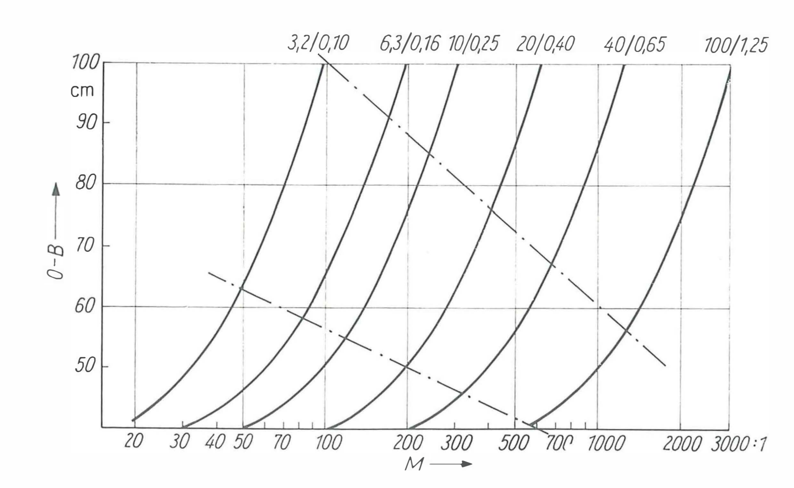


Bild 8.21
Ermittlung des Abbildungsmaßstabs einer mikrofotografischen Aufnahme mit Hilfe des Objekt/Bildabstands für Zeiss-Planachromate und Okular PK 10×

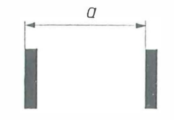
tung (Bild 8.22). Bei Verwendung einer Objektmeßplatte 0,01, bei der die Strecke 1 mm in 100 Teile unterteilt ist, ist

$$M_{\text{Negativ}} = (100\,a) : 1, \tag{8.11}$$

wenn a der in der Bildebene gemessene Abstand zweier Teilstriche, und

$$M_{\text{Negativ}} = (100\,b/n) : 1, \tag{8.12}$$

wenn b über n Teilstrichen in der Bildebene gemessen wurde (a und b in mm).



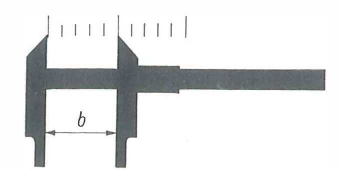


Bild 8.22 Messung des Abbildungsmaßstabs in der Bildebene

Hinsichtlich des „förderlichen Abbildungsmaßstabs" gelten die im Abschn. 8.2.4.5. gemachten Ausführungen auch für die Großformat-Mikrofotografie.

8.2.5.5. Balgenkamera für Kleinbildaufnahmen

Bei der Anfertigung von Kleinbild-Mikroaufnahmen besteht oft der Wunsch, mit stufenlos veränderlichem Abbildungsmaßstab zu arbeiten. Das läßt sich, zwar recht aufwendig, durch die Verwendung eines pankratischen Projektivs erreichen. Eine dieser Forderung genügende Einrichtung kann aber auch aus dem Kleinbild-Kamerazubehör aufgebaut werden, wenn für die Kamera ein Reproduktionsgestell und dazu ein Balgen-Naheinstellgerät zur Verfügung stehen. Spiegelreflexeinstellung der Kamera ist zur bequemen und sicheren Einstellung des Bilds zu bevorzugen (Bild 8.23). Mit dem gezeigten Aufbau werden optische Kameralängen von 100 bis 270 mm erreicht. Mit dem gleichen Geräteaufbau können auch Kleinbild-Lupenaufnahmen angefertigt werden. In beiden Fällen gestattet die Verwendung einer Kleinbildkamera mit Innenbelichtungsmessung – ausreichende Helligkeit des mikroskopischen Bilds vorausgesetzt – die Durchführung des Verfahrens einer Belichtungszeitmessung.

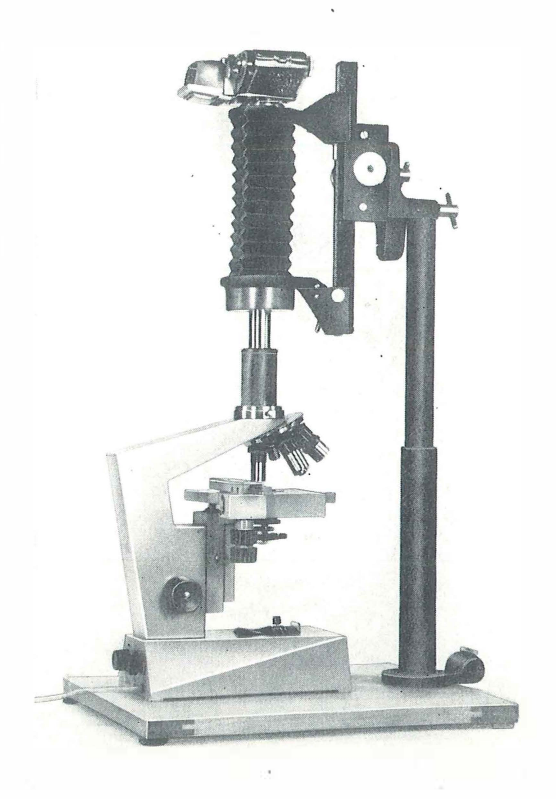


Bild 8.23. Balgenkamera für Kleinbildaufnahmen mit stufenlos veränderlichem Abbildungsmaßstab

Mikroskop LABOVAL 2 und IHAGEE-Vielzweckgerät mit Kleinbildkamera EXAKTA VAREX

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

8.2.5.6. Lupenfotografie mit der Balgenkamera

Mikrofotografische Balgenkameras sind meist auch für die Großformat-Lupenfotografie eingerichtet (Bild 8.24). Man erreicht mit den zur Durchlicht-Lupenfotografie geeigneten Objektiven M des VEB Carl Zeiss JENA Abbildungsmaßstäbe von 10 : 1 bis 63 : 1.

Der Abbildungsmaßstab einer lupenfotografischen Aufnahme kann nach Gl. (8.10) überschlagsmäßig errechnet werden. In der Praxis wird man den Abbildungsmaßstab der Aufnahme indessen in der Bildebene messen.

Diese Messung basiert auf der Gleichung

$$M = \frac{y'}{y} = \frac{\text{Bildgröße}}{\text{Objektgröße}}. \tag{8.13}$$

Auch bei der Lupenfotografie mit der Balgenkamera kann die Bestimmung des Abbildungs-

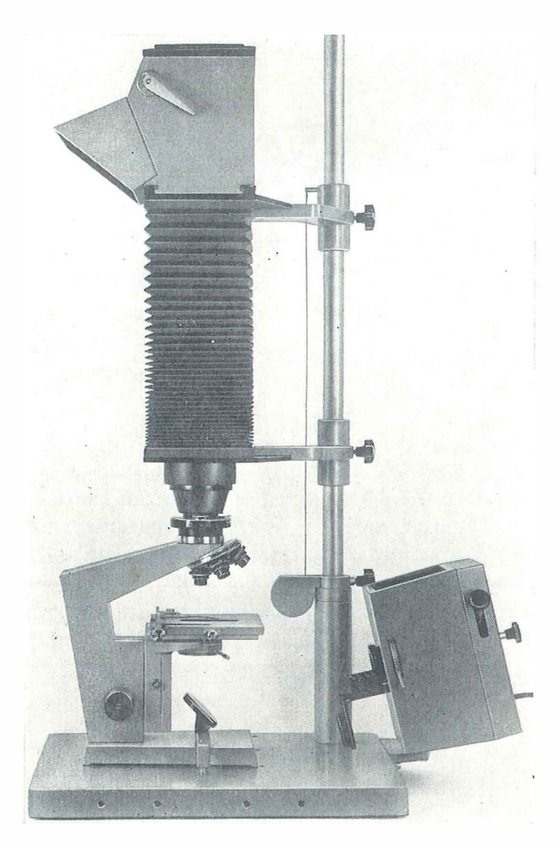


Bild 8.24. Balgenkamera für Großformat-Lupenaufnahmen LABOVAL-st
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

maßstabs durch Messen des Objekt/Bildabstands vorgenommen werden.
Die Balgenkamera kann darüber hinaus auch ohne Mikroskop zur Lupenfotografie benutzt werden. In diesem Fall werden Objektiv und Verschluß in die Kamerafrontplatte eingesetzt. So sind auch längerbrennweitige lupenfotografische Objektive (z.B. $f =$ 60 bis 120 mm) verwendbar. Zur Beleuchtung des Objekts dienen dann Großfeldbeleuchtungseinrichtungen für Durchlicht oder spezielle Beleuchtungseinrichtungen für Auflicht.

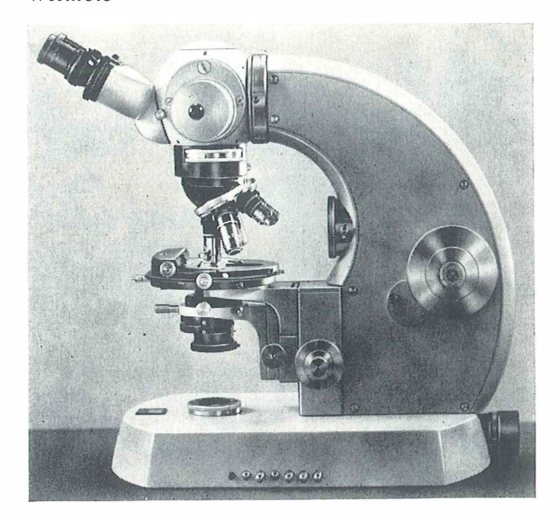
8.2.6. Mikrofotografie mit einem Kameramikroskop

Ein Kameramikroskop kann auf zwei Arten aufgebaut werden. Einmal als Spezialgerät – als Fotomikroskop –, das die mikrofotografische Kamera enthält. Zum anderen sind eine Reihe von Fotoaufsätzen für Mikroskope bekannt geworden, mit denen ein Mikroskop nach dem Baukastenprinzip zu einem Fotomikroskop ausgebaut werden kann.
Grundsätzlich erfüllen beide Bauformen ihren Zweck. Die Baukastenform hat den Vorteil, ein beliebiges Mikroskop zu einem beliebigen Zeitpunkt in ein Fotomikroskop umwandeln zu können. Das Spezialmikroskop kann dagegen in geschlossener Bauart und mit größerem Bedienungskomfort ausgeführt werden.
Nach dem Aufnahmeformat kann in beiden Gruppen schließlich noch zwischen Kleinbild- und Großformat-Kameramikroskopen unterschieden werden.

8.2.6.1. Kleinbild-Kameramikroskop in geschlossener Bauart

Von der gerätetechnischen Konzeption eines Kleinbild-Kameramikroskops wird erwartet, daß neben dem raschen und bequemen Wechsel des Mikroskopierverfahrens die Wahl des Bildausschnitts sicher erfolgen und dabei der Abbildungsmaßstab ohne Umbau des Geräts variiert werden kann. Ständige Aufnahmebereitschaft, Belichtungsautomatik und automatischer Filmtransport sollen es dem Mikroskopiker ferner ermöglichen, sich während seiner Tätigkeit voll auf die mikroskopische Untersuchung konzentrieren zu können –, die fotografische Registrierung des Untersuchungsergebnisses in allen seinen Phasen muß ohne Ablenkung durch fotografische Arbeitsgänge möglich sein.

Bild 8.25. Kleinbild-Kameramikroskop FOTOMIKROSKOP II
Firma Opton, Feintechnik GmbH, Oberkochen Werkfoto



Der älteste Vertreter eines Kleinbild-Kameramikroskops in geschlossener Bauart ist das MIKROPHOT des VEB Rathenower Optische Werke. Dieses Gerät ist durch eine eingebaute Kleinbildkassette gekennzeichnet. Zum Zeitpunkt seines Erscheinens existierte eine mikrofotografische Belichtungsautomatik noch nicht.

Den gleichen Grundaufbau – mit Belichtungsautomatik – zeigt das FOTOMIKROSKOP der Firma Opton Feintechnik, Oberkochen (BRD), (Bild 8.25). Die beiden Geräte sind durch feste Projektiv-Abbildungsmaßstäbe gekennzeichnet.

Beim Fotomikroskop DOCUVAL des VEB Carl Zeiss JENA (Bild 8.26) ist mit Hilfe eines eingebauten pankratischen Projektivs eine stufenlose Veränderung des Abbildungsmaßstabs möglich.

Innerhalb seiner Geräteklasse nimmt das DOCUVAL – was seine Ergänzungsmöglichkeiten zur Mikrofotografie angeht – insofern eine Sonderstellung ein, als es durch Aufsetzen eines Kameraansatzes aus dem System der Aufsetzkamera (s. Abschn. 8.2.4.4.) auf den an diesem Fotomikroskop vorhandenen „Zweitausgang" auch für die Mittel- und Großformat-Mikrofotografie ausgebaut werden kann (Bild 8.27). Die optische Konjugation mit dem binokularen Einstelltubus

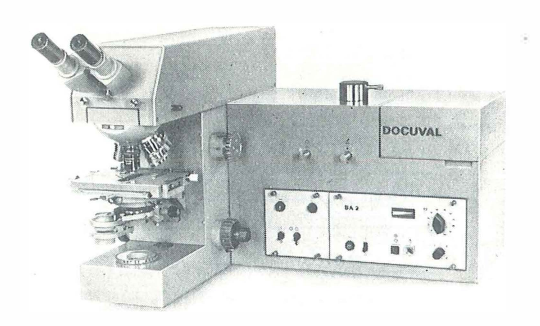


Bild 8.26. Fotomikroskop DOCUVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

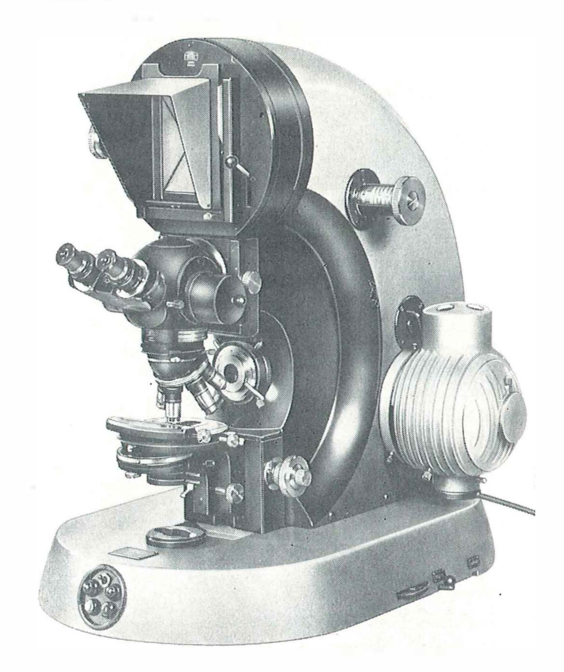
Bild 8.27. Wechselmöglichkeit des Aufnahmeformats am Fotomikroskop DOCUVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

sowie der zur Fotografie gewählte Bildausschnitt bleiben dabei unabhängig vom gewählten Aufnahmeformat erhalten. Darüber hinaus ermöglicht der Zweitausgang den Ausbau des Fotomikroskops zur Fernsehmikroskopie und zur Mikroprojektion – in beiden Fällen mit der Möglichkeit einer schnellen mikrofotografischen Registrierung des demonstrierten Objekts mit Hilfe der eingebauten Kleinbildkamera.

8.2.6.2. Großformat-Kameramikroskop in geschlossener Bauart

Die ältesten Vertreter sind das ULTRAPHOT von Carl Zeiss JENA und das PANPHOT von Leitz, Wetzlar (BRD); bei beiden Geräten erfolgt die Variation des Abbildungsmaßstabs bei vorgegebenem Objektiv durch Änderung der Okularvergrößerung und der optischen Kameralänge. Von Opton Feintechnik, Oberkochen (BRD), wird als Vertreter dieser Geräteklasse das ULTRAPHOT-II (Bild 8.28) gefertigt, bei dem die Kameralänge mit einem eingebauten Spiegelwagen geändert wird.
Eine bedeutende Rolle spielen Kameramikroskope seit langem in der Auflichtmikroskopie.

Bild 8.28. Großformat-Kameramikroskop ULTRAPHOT II
Firma Opton, Feintechnik GmbH, Oberkochen, Werkfoto



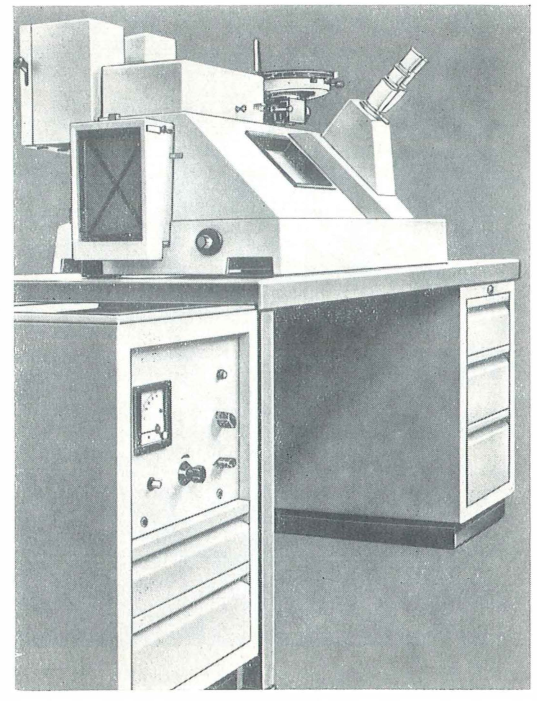


Bild 8.29. Großformat-Kameramikroskop NEOPHOT 2
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Stellvertretend für ein solches Gerät stellt Bild 8.29 das NEOPHOT 2 des VEB Carl Zeiss JENA dar. In das Gerät ist eine Belichtungsautomatik eingebaut. Die Änderung des Abbildungsmaßstabs erfolgt mit einem in das Mikroskop eingebauten optischen Vergrößerungswechsler, mit dem bei einer Grundkameralänge von 250 mm die in der Metallografie standardisierten Abbildungsmaßstäbe erreicht werden. Eine zusätzliche mechanische Verstellmöglichkeit der Kameralänge erlaubt sowohl die exakte Einstellung eines vorgegebenen Abbildungsmaßstabs als auch die Einstellung der zwischen den Stufen des Vergrößerungswechslers liegenden Maßstäbe.

8.2.6.3. Kleinbild-Kameramikroskop in Baukastenform

Durch Aufsetzen von weitgehend automatisierten Fotoaufsätzen auf ein Mikroskop entstehen Geräte, die die Funktion eines Kameramikroskops übernehmen können. Einen ersten Schritt in dieser Richtung stellt die Automatisierung von Belichtung und Filmtransport dar, wie er sich bereits mit Bauteilen der Aufsetzkamera erreichen läßt (Bild 8.30). Gegenüber der Aufsetzkamera mit ihrem monokularen Einstellsystem weisen

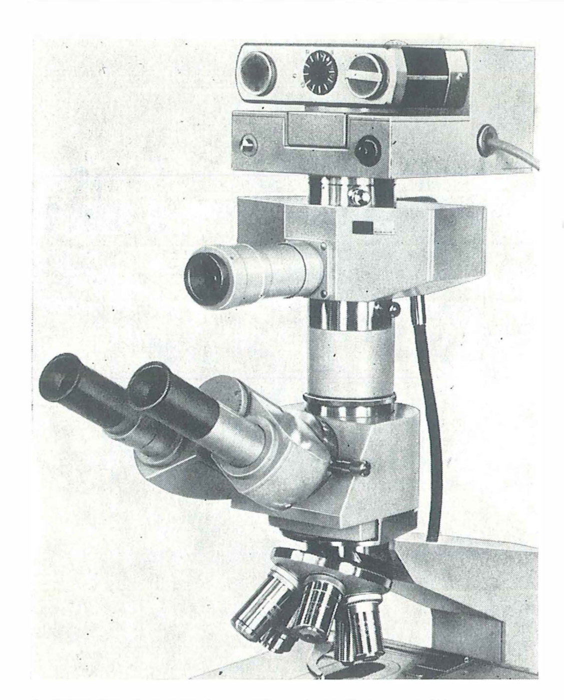


Bild 8.30. Mehrformat-Kameramikroskop in Baukastenform
Mikroskop ERGAVAL
mit automatischer Aufsetzkamera mf · *matic*
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

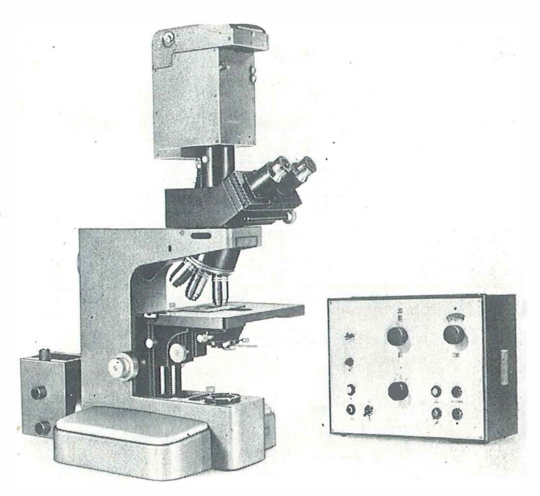
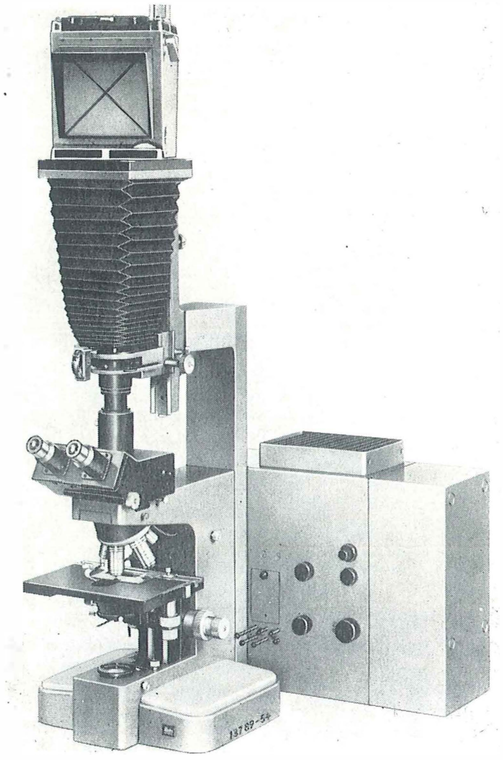


Bild 8.31. Kleinbild-Kameramikroskop in Baukastenform
Mikroskop ORTHOPLAN mit automatischer Aufsetzkamera ORTHOMAT
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

Bild 8.32. Großformat-Kameramikroskop in Baukastenform
Mikroskop ORTHOPLAN mit Balgenkamera und Lampenhaus 500
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto



Kameramikroskope in Baukastenform einen binokularen Einblick auf. Dabei kann die Konjugation der beiden Zwischenbildebenen auf der Einblick- und der Fotoseite zur Scharfeinstellung des Bilds genutzt werden. Zur Beurteilung des Formatausschnitts sind dann spezielle Bildfeldokulare mit Formatfiguren erforderlich. Derartige Geräte sind z.B. der ORTHOMAT (Bild 8.31) und die Fotoautomatik von Wild, Heerbrugg, Schweiz. Während das erste Gerät ausschließlich für die Kleinbild-Mikrofotografie ausgelegt ist, erlaubt das zweite die wahlweise Anwendung verschiedener Aufnahmeformate.

8.2.6.4. Großformat-Kameramikroskop in Baukastenform

Ähnlich wie durch Aufsetzen eines Kleinbild-Fotoaufsatzes auf ein serienmäßig gefertigtes Mikroskop ein Gerät mit der vollen Funktion eines Kameramikroskops entsteht, kann diese Bauform auch auf die Großformat-Mikrofotografie ausgedehnt werden. Diese Möglichkeit besteht für das ORTHOPLAN von Leitz, Wetzlar (BRD), und ist im Bild 8.32 dargestellt.

Die angesetzte Balgenkamera kann mit einer Belichtungsautomatik ausgerüstet werden. Dem größeren Lichtbedarf der Großformat-Mikrofotografie wird durch eine Hochleistungs-Mikroskopierleuchte entsprochen.

8.2.6.5. Handhabung eines Kameramikroskops

Was die Handhabung eines Kameramikroskops hinsichtlich der für die Mikrofotografie maßgebenden Dinge angeht, so lassen sich die Verhältnisse einer Aufsetzkamera oder einer Balgenkamera auch auf ein Kameramikroskop übertragen und gelten hier sinngemäß.

8.2.7. Fotografische Seite der Mikrofotografie

Der Erfolg einer mikrofotografischen Bildwiedergabe hängt von der richtigen Handhabung des Mikroskops und einer sicheren Beherrschung des fotografischen Prozesses ab. Nachfolgend sollen die für die Mikrofotografie wesentlichen Dinge der Fotografie kurz umrissen werden.

8.2.7.1. Grundzüge der Schwarzweißfotografie

Ein Fotomaterial wird durch die Angabe seiner Haupteigenschaften charakterisiert. Diese sind:

Lichtempfindlichkeit

Die Bestimmung der Lichtempfindlichkeit eines Fotomaterials wird nach unterschiedlichen Verfahren vorgenommen. In Tafel 8.6 wird ein Vergleich der beiden gebräuchlichsten Empfindlichkeitsangaben nach DIN und ASA gezeigt.
Dabei wird doppelte Lichtempfindlichkeit durch Zuwachs der DIN-Zahl um +3 bzw. durch Faktor 2 × der ASA-Zahl zum Ausdruck gebracht.

Farbenempfindlichkeit

Die Farbenempfindlichkeit eines Schwarzweißmaterials sagt aus, in welchem Strahlungsbereich Schwärzung erzielt werden kann. Bei allen Fotoschichten ist zunächst einmal eine UV- und Blauempfindlichkeit von etwa 200 bis 500 nm vorhanden. Die zur Kennzeichnung der Farbenempfindlichkeit üblichen Handelsbezeichnungen und die daraus erkennbare Farbenempfindlichkeit sind in Tafel 8.7 vereinfacht zusammengestellt.
Die Angaben sind als Hinweis für die bei der Verarbeitung des Materials zulässige Dunkelkammerbeleuchtung zu verstehen. Genauere Auskunft über die Farbenempfindlichkeit geben die relative spektrale Empfindlichkeit sowie das Spektrogramm (Bild 8.33).
Die relative spektrale Empfindlichkeit gestattet Aussagen darüber, in welchem Strahlungsbereich

Tafel 8.6. Vergleich der Lichtempfindlichkeitsangaben nach DIN und ASA

DIN	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
ASA	8	10	12	16	20	25	32	40	50	64	80	100
DIN	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
ASA	125	160	200	250	320	400	500	640	800	1000	1250	1600
DIN	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43		
ASA	2000	2500	3200	4000	5000	6400	8000	10000	12500	16000		

Tafel 8.7. Angaben der Farbenempfindlichkeit eines Fotomaterials

Kennzeichnung	Empfindlichkeitsbereich nm	Empfindlichkeit für die Farben
Unsensibilisiert	200 ... 500	UV, Violett und Blau
Orthochromatisch	200 ... 600	UV, Violett, Blau, Grün und Gelb
Panchromatisch	200 ... 700	UV, Violett, Blau, Grün, Gelb und Rot
Infrarotempfindlich	400 ... 500	UV, Violett, Blau sowie
	700 ... 1100[1])	Infrarot

[1]) Die Empfindlichkeitsgrenze im langwelligen Bereich ist verschieden und vom benutzten Sensibilisator abhängig.

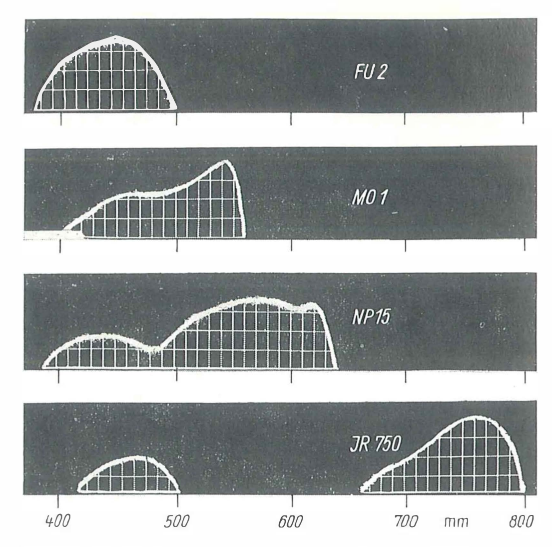


Bild 8.33. Spektrogramme verschieden sensibilisierter Fotoschichten bei Belichtung mit Kunstlicht (3200 K)
unsensibilisiert: ORWO-FU 2;
orthochromatisch: ORWO-MO 1;
panchromatisch: ORWO-NP 15;
IR-empfindlich: ORWO-IR 750
VEB Filmfabrik Wolfen

eine Schwärzung erzielt werden kann, und geht dabei von einem energiegleichen Spektrum aus. Die effektive spektrale Empfindlichkeit geht von einer definierten Beleuchtung (meist Kunstlicht 3200 K oder Tageslicht 5500 K) aus und ermöglicht über das sog. Spektrogramm des Fotomaterials eine Aussage über den bei dieser Beleuchtungsart wirksamen Strahlungsbereich.

Gradation

Zur Angabe der Gradation wird die Schwärzungskurve des Fotomaterials herangezogen. Die Schwärzungskurve (Bild 8.34) zeigt die Schwärzung in Abhängigkeit von der Belichtung. Nur im geradlinigen Teil der Kurve ist die Schwärzung der Belichtung proportional. Die Neigung des geradlinigen Teils gibt Auskunft über die Gradation des Fotomaterials. Der Tangens des Winkels α, den dieser Teil mit der Abszisse bildet, dient als „Gamma-Wert" zur zahlenmäßigen Angabe der Gradation. Die Gradation $\gamma = 1$ wird als „normal" bezeichnet; das bedeutet Kurvenanstieg unter 45°. Materialien mit $\gamma > 1$ werden als „hart", mit $\gamma < 1$ als „weich" arbeitend bezeichnet.
Der geradlinige Teil der Schwärzungskurve ist aber nicht nur das Maß für die Gradation, sondern läßt auch Rückschlüsse auf den Belichtungs-

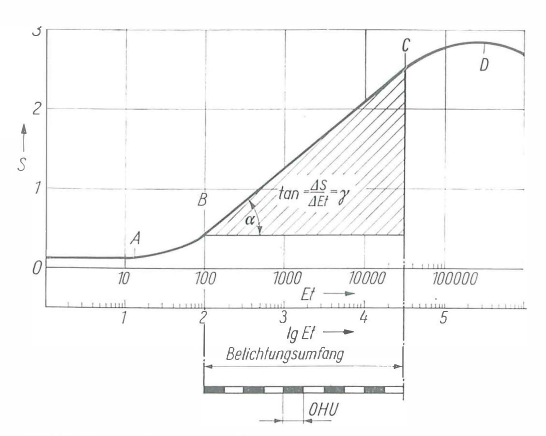


Bild 8.34. Schwärzungskurve

umfang und damit auf den Belichtungsspielraum zu.
Projiziert man die den geradlinigen Teil der Schwärzungskurve begrenzenden Punkte B und C auf die Abszisse, dann kann dort der Helligkeitsumfang abgelesen werden, den das Material bei Entwicklung zu diesem Gamma-Wert tonwertrichtig wiedergeben kann. Dieser Wert kann aus den zugehörigen Belichtungswerten auch zahlenmäßig als „Belichtungsumfang" angegeben werden.
Aus dem Belichtungsumfang kann auf den Belichtungsspielraum des für den Aufnahmegegenstand bekannten oder vorgegebenen Helligkeitsumfangs geschlossen werden.
Der Belichtungsumfang einer fotografischen Schicht ist in starkem Maße von der Gradation abhängig (Bild 8.35). Ganz allgemein kann gesagt werden, daß der Belichtungsumfang einer hart arbeitenden Schicht (BU_h) kleiner und der einer

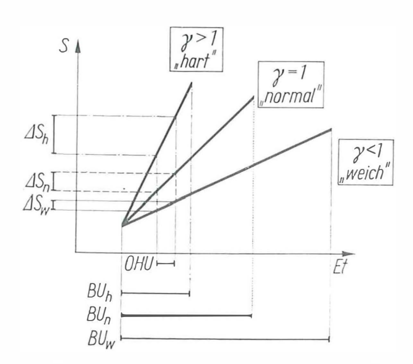


Bild 8.35. Belichtungsumfang BU und Umsetzung eines gegebenen Objekthelligkeitsumfangs (OHU) in Schwärzungsunterschiede (ΔS) bei einer hart, einer normal und einer weich arbeitenden Fotoschicht

weich arbeitenden Schicht (BU_w) größer als der einer normal arbeitenden Schicht (BU_n) ist.
Die Gradation ist bei einem Aufnahmegegenstand vorgegebenen Helligkeitsumfangs auch dafür maßgebend, wie die Helligkeitsunterschiede in Schwärzungsunterschiede umgesetzt werden, und so die für den Kontrast im fotografischen Bild entscheidende Größe. Während von einer zum Gamma-Wert 1 entwickelten Fotoschicht gegebene, im Beispiel Bild 8.35 angenommene Objekthelligkeitsunterschiede (*OHU*) „tonwertrichtig" in entsprechende Schwärzungsunterschiede ΔS_n umgesetzt werden, können die gleichen Objekthelligkeitsunterschiede durch eine steile Gradation zu größeren Schwärzungsunterschieden (ΔS_h) verstärkt, durch eine flache Gradation dagegen zu geringeren Schwärzungsunterschieden (ΔS_w) vermindert werden. Der im Negativ vorhandene Kontrast kann im Negativ/Positiv-Prozeß dann nochmals verändert werden (s. Abschnitt 8.2.7.2.).
Die Gradation ist entwicklungsabhängig. Die vom Hersteller des Fotomaterials angegebenen Gamma-Werte gelten nur für die dabei gleichzeitig genannte Entwicklung. Bei einem gegebenen Entwickler ist der Gamma-Wert von der Entwicklungszeit und der Entwicklertemperatur abhängig. Auskunft darüber gibt die „Gamma-Zeit-Kurve" (Bild 8.36).

Auflösungsvermögen und Körnigkeit

Das Auflösungsvermögen (*AV*) einer Fotoschicht ist nicht unbegrenzt. Das *AV* wird in Linien je mm angegeben, wobei eine Angabe *AV* = 100 L/mm

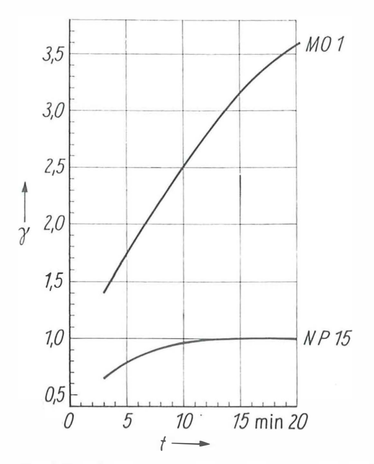
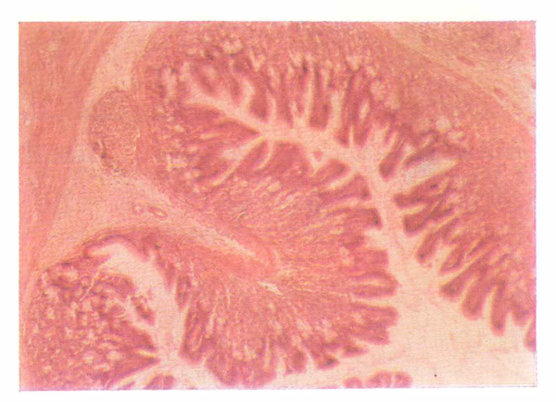


Bild 8.36. Gamma-Zeit-Kurven für ORWO-NP 15 und ORWO-MO 1 bei Entwicklung im ORWO-Entwickler RO 9; 1:20 (Schalenentwicklung bei +20°C)

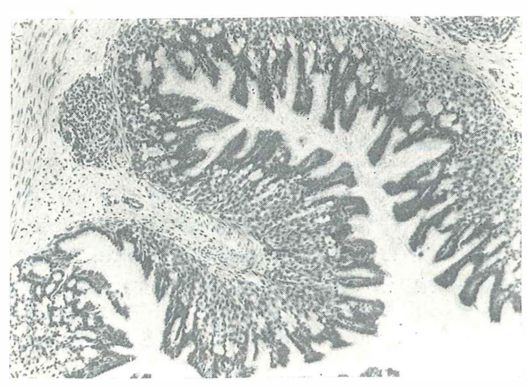
aussagt, daß dieses Material aufbelichtete Struktureinzelheiten im Abstand von 10 μm auflösen kann.
Zur Charakterisierung der Körnigkeit dient die *K*-Zahl. Ein Material höherer *K*-Zahl ist grobkörniger als eines mit geringerer *K*-Zahl.
Mit steigender Lichtempfindlichkeit ist eine Erhöhung der *K*-Zahl und eine Abnahme des *AV* verbunden.

Schwarzschild- und UKZ-Effekt

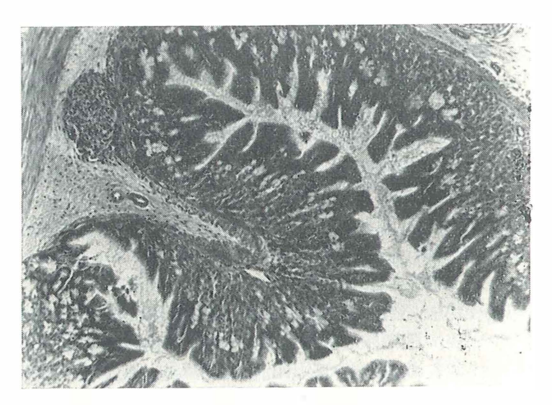
Die Belichtung setzt sich aus den Faktoren Beleuchtungsstärke und Belichtungszeit zusammen ($B = Et$). Nach der Bunsen-Roscoeschen Reziprozitätsregel hängt die fotochemische Wirksamkeit der Strahlung nur vom Produkt $E\,t$, nicht aber von den Beträgen der beiden dieses Produkt bestimmenden Faktoren ab. Die Reziprozitätsregel versagt bei geringen Beleuchtungsstärken – eine Verdoppelung der Belichtungszeit führt nicht mehr zu einer Verdoppelung der Schwärzung. Sie versagt auch bei hohen Beleuchtungsstärken und den damit verbundenen ultrakurzen Belichtungszeiten, das sind Belichtungszeiten unter $^1/_{1000}$ s.
Die erste Erscheinung wird nach ihrem Entdecker als Schwarzschild-Effekt, die zweite als Ultrakurzzeit-Effekt (UKZ-Effekt) bezeichnet.
Allgemein kann gesagt werden, daß im Bereich der normalen Bildhelligkeiten der allgemeinen Fotografie für einen Belichtungszeitbereich von etwa 1 bis $^1/_{1000}$ s Korrekturen in der überwiegenden Anzahl der Fälle nicht notwendig sind. Schwarzschild- und UKZ-Effekt sind für die Mikrofotografie dann ohne Belang, wenn die Belichtung des Materials nach Belichtungsprobe oder lichtelektrischer Messung über eine Eichkurve vorgenommen wird.
Von Bedeutung für die Mikrofotografie wurde der Schwarzschild-Effekt mit dem Aufkommen der Belichtungsautomaten und der UKZ-Effekt mit der Einführung des Elektronenblitzes als mikrofotografische Lichtquelle. Bei Blitzeinrichtungen geht der UKZ-Effekt ebenfalls in die Eichung der Einrichtung ein. Eine entsprechende Entwicklungskorrektur wird dabei vorausgesetzt. Bei der Anwendung von Belichtungsautomaten läßt sich der Schwarzschild-Effekt dadurch berücksichtigen, daß man der Belichtungsautomatik-Eichung das benutzte mikroskopische Beleuchtungsverfahren zugrunde legt. Innerhalb der einzelnen Beleuchtungsverfahren der Mikroskopie streut die Belichtungszeit selten mehr als 1 : 100, und für diese Streubreite kann der Schwarzschild-Effekt bei Schwarzweißaufnahmen vernachlässigt werden.



Farbaufnahme auf Umkehrfilm



Aufnahme auf orthochromatischem Material ohne Lichtfilter



Aufnahme auf panchromatischem Material ohne Lichtfilter



Aufnahme auf panchromatischem Material mit Grünfilter

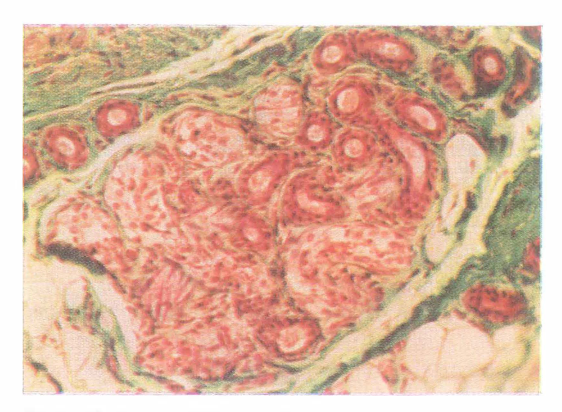


Aufnahme auf panchromatischem Material mit Blaufilter



Aufnahme auf panchromatischem Material mit Rotfilter

Bild 8.37. Schwarzweißmikrofotografie I
Einfluß der Farbenempfindlichkeit des Fotomaterials und Wirkung von Lichtfiltern auf die Bildwiedergabe einer HE-Färbung



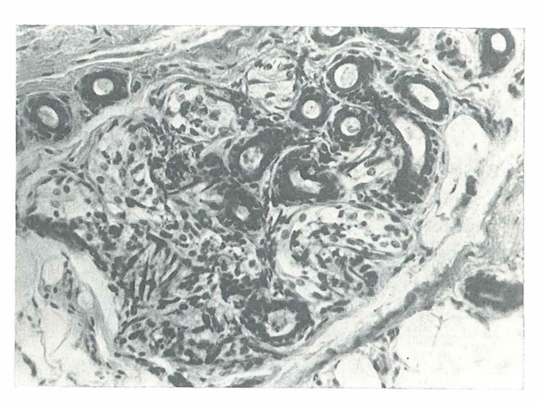
Farbaufnahme auf Umkehrfilm



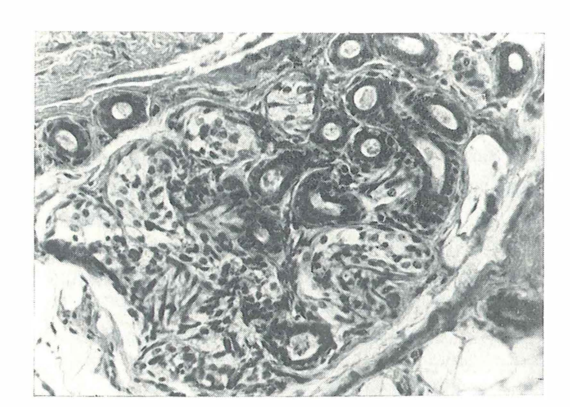
Aufnahme auf orthochromatischem Material ohne Lichtfilter



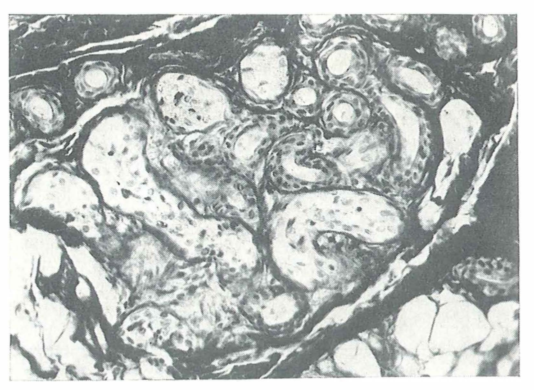
Aufnahme auf panchromatischem Material ohne Lichtfilter



Aufnahme auf panchromatischem Material mit Grünfilter



Aufnahme auf panchromatischem Material mit Blaufilter



Aufnahme auf panchromatischem Material mit Rotfilter

Bild 8.38. Schwarzweißmikrofotografie II
Einfluß der Farbenempfindlichkeit des Fotomaterials und Wirkung von Lichtfiltern auf die Bildwiedergabe einer GOLDNER-Färbung

8.2.7.2. Möglichkeiten zur Änderung des Bildkontrastes

Der Bildkontrast einer mikrofotografischen Aufnahme kann durch Eingriffe in den mikroskopischen Strahlengang (z.B. durch Abblenden am Kondensor oder durch Anwendung eines optischen Kontrastverfahrens), durch Eingriffe am Objekt (Präparier- und Färbetechnik) sowie durch fototechnische Manipulationen beeinflußt werden. Auf letztere soll nachfolgend eingegangen werden.

Kontraständerung durch Entwicklung zu verschiedenen Gamma-Werten

Wenngleich die Entwicklung zu einer normalen bis weichen Gradation die Regel sein sollte, erfordern viele mikrofotografische Aufnahmen wegen des zu geringen Objektkontrastes eine Entwicklung zu einem höheren Gamma-Wert. Das ist vor allem bei einfarbigen Objekten oft die einzige Möglichkeit zur Kontraststeigerung.
Geht man von einem bestimmten Material und Entwickler aus, dann kann im einfachsten Fall eine Änderung des Gamma-Werts durch eine Variation der Entwicklungszeit erzielt werden (Bild 8.36).

Tafel 8.8. Abhängigkeit des Gamma-Werts von der Entwicklung für die ORWO-Mikroplatte MO1

Entwickler	Entwicklungszeit bei 20 °C min	Gamma-Wert
ORWO 12	8	0,8
ORWO 12	12	1,0
ORWO F 43	10	1,2
ORWO R 09 1 : 20	4	1,5
ORWO R 09 1 : 10	4	1,8
ORWO 74	3	2,0
ORWO 74	4	2,4

Eine Änderung des Gamma-Werts ist aber auch durch Entwicklung in verschiedenen Entwicklern möglich. Diese Möglichkeiten sind in Tafel 8.8 am Beispiel der ORWO-Mikroplatte MO 1 zusammengestellt.

Kontraständerung durch den Negativ/Positivprozeß

Aus der Goldberg-Bedingung für eine tonwertrichtige Wiedergabe

$$\gamma_{\text{Negativ}} \gamma_{\text{Positiv}} = 1 \tag{8.14}$$

kann abgeleitet werden, daß ein zu einem niedrigen Gamma-Wert entwickeltes Negativ zu einem Positiv mit entsprechend höherem Gamma-Wert kopiert werden muß, damit das Produkt beider Gamma-Werte den geforderten Wert 1 erreicht. In der Praxis ist für Papierbilder allerdings meist ein Gamma-Produkt > 1 notwendig.
Zur Steigerung des Bildkontrasts einer mikrofotografischen Aufnahme ist oftmals eine Abkehr von der Goldberg-Bedingung notwendig.
Wird, z.B. bei metallografischen Aufnahmen, das Negativ einer Mikroaufnahme aus Gründen der Kontraststeigerung zu einem Gamma-Wert > 1 entwickelt, so kann zur weiteren Steigerung des Bildkontrastes das Positiv auf ein normal bis hart arbeitendes Papier kopiert werden.

Kontraständerung durch Lichtfilter

Diese Maßnahme setzt die Verwendung panchromatischen Fotomaterials voraus. Soll eine Objektfarbe im Positiv hervorgehoben, also dunkler wiedergegeben werden, dann ist bei der Aufnahme ein zu dieser Farbe komplementärfarbiges (s. dazu Bild 8.41) Filter zu wählen. Soll dagegen eine Objektfarbe unterdrückt werden, im Positiv also hell erscheinen, dann ist ein dieser Objektfarbe gleichfarbiges Lichtfilter zu wählen. In den Bildern 8.37 und 8.38 sind dazu Beispiele dargestellt.

8.2.7.3. Fotografische Schnellverfahren

Der Zeitaufwand für eine fotografische Aufnahme wird von den Arbeitsgängen Entwicklung, Fixage, Wässerung und Trocknung bestimmt. Zur Abkürzung des Prozesses sind verschiedene Verfahren der Schnellentwicklung sowie Methoden zur Verkürzung der Wässerungs- und Trockenzeit bekannt, die in der praktischen Mikrofotografie jedoch selten angewendet werden.
Mit dem Polaroid-Land-Verfahren steht aber ein fotografisches Schnellverfahren zur Verfügung, das auch für die Mikrofotografie von Bedeutung ist. Zur Durchführung des Polaroid-Verfahrens sind besondere Kamerarückteile bzw. Kassetten und das spezielle Polaroid-Material notwendig. Für viele mikrofotografische Einrichtungen gibt es Polaroid-Adapter, z.B. für die Aufsetzkamera (Bild 8.39), für die Balgenkamera und auch für das Kameramikroskop (Bild 8.40).

8.2.7.4. Praxis der Farbenmikrofotografie

Wenngleich die Entwicklung und Kopierung von Farbfilmen im mikrofotografischen Laborato-

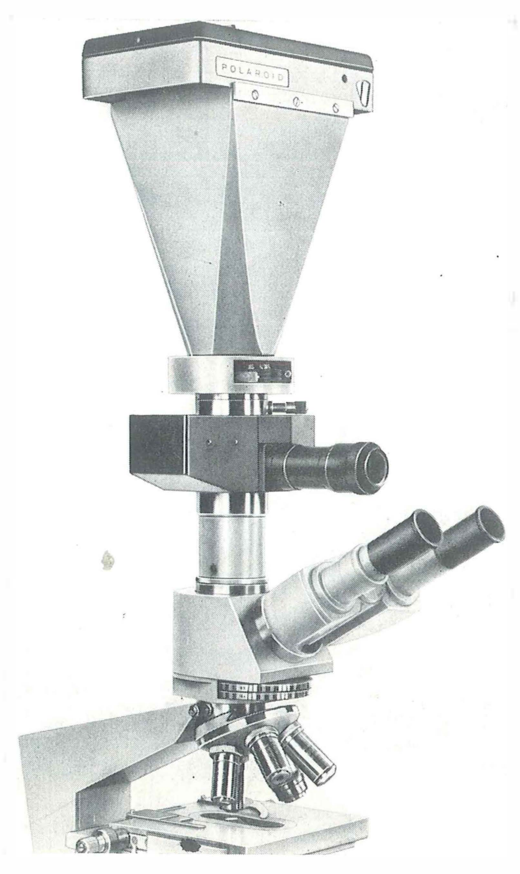


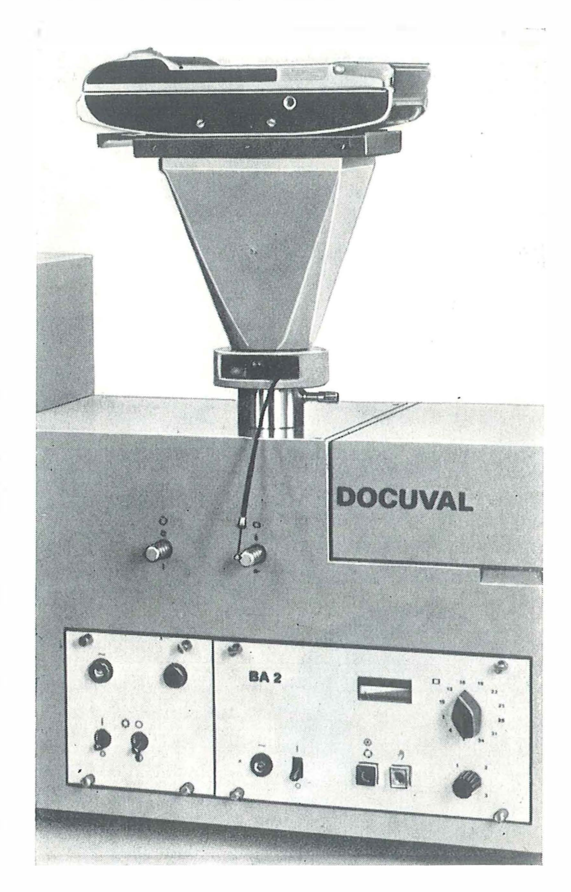
Bild 8.39. Anpassung eines Polaroid-Rückteils an die Aufsetzkamera
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

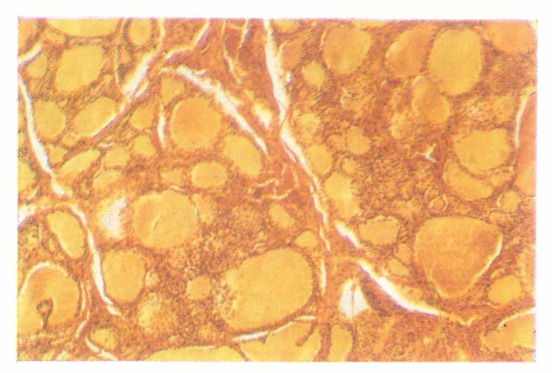
rium auch selbst vorgenommen werden können, beschränkt sich die praktische Durchführung der farbenmikrofotografischen Bildwiedergabe für den Mikrofotografen meist auf die Belichtung des Materials. So gesehen, bereitet die farbige Wiedergabe mikroskopischer Objekte keine besonderen Schwierigkeiten, zumal die gleichen mikrofotografischen Geräte verwendet werden wie bei Schwarzweißaufnahmen.
An die optische Ausrüstung des Mikroskops sowie die Präparation – besonders Färbung und farbstichfreie Einbettung des Objekts – werden naturgemäß höhere Anforderungen gestellt; vor allem deshalb, weil bei Farbaufnahmen eine Kontraststeigerung mit fotografischen Mitteln nicht ohne weiteres möglich ist.
So kommen der Wahl des Farbfilmmaterials, der Angleichung der Beleuchtung an den gewählten Farbfilmtyp und der exakten Belichtung die entscheidende Bedeutung zu.

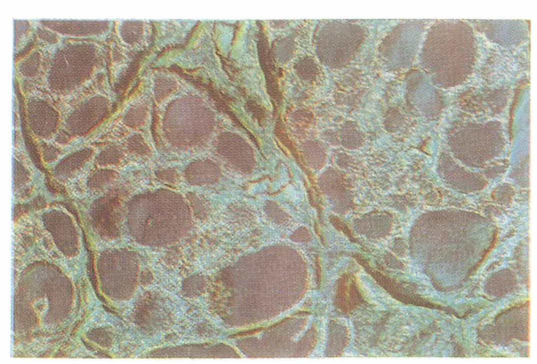
Umkehr- und Negativ/Positivverfahren

Während der Umkehrprozeß keine nennenswerten Korrekturen erlaubt und nur ein Unikat in Gestalt eines Diapositivs liefert, das zwar grundsätzlich mit Duplikatmaterial oder über ein Zwischennegativ vervielfältigt werden kann, ist es der oft genannte Vorteil des Color-Negativ/Positivprozesses, daß beim Kopieren eine Korrektur der Farbenwiedergabe möglich ist. Diese setzt aber die Kenntnis der Objektfarben voraus, so daß sie – wenn nicht vom Mikrofotografen selbst durchgeführt – für die praktische Farbenmikrofotografie recht problematisch ist. So wird der Negativ/Positivprozeß wohl meist nur dort angewendet, wo er zur Vervielfältigung des Farbbilds unumgänglich ist, und dabei oftmals noch ein Umkehrfarbbild als Hinweis für die Farbensteuerung aufgenommen.

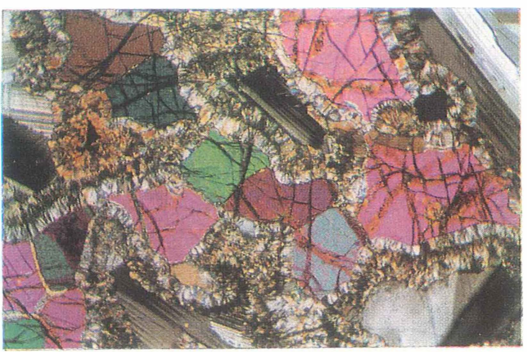
Bild 8.40. Ausbau eines Kameramikroskops zur Polaroid-Mikrofotografie
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

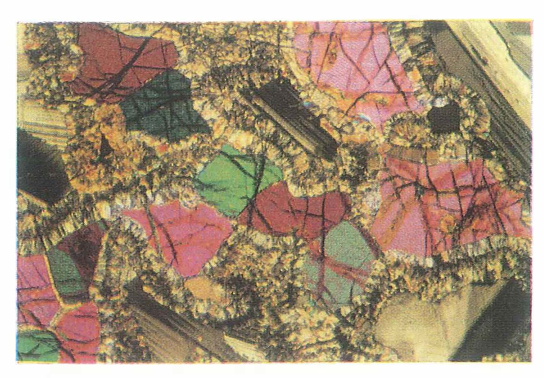



Aufnahme auf Umkehrfarbfilm

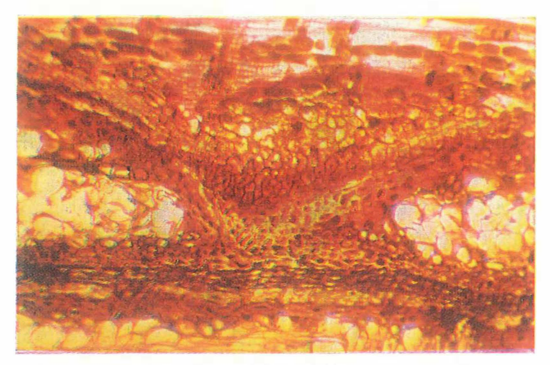

Aufnahme auf Negativfarbfilm

Wahl des Farbfilmverfahrens und des Farbfilmtyps


Aufnahme auf Tageslicht-Umkehrfilm


Aufnahme auf Kunstlicht-Umkehrfilm

Farbaufn. bei Tageslichtcharakter der Beleuchtung


Aufnahme auf Tageslicht-Umkehrfilm


Aufnahme auf Kunstlicht-Umkehrfilm

Farbaufn. bei Kunstlichtcharakter der Beleuchtung

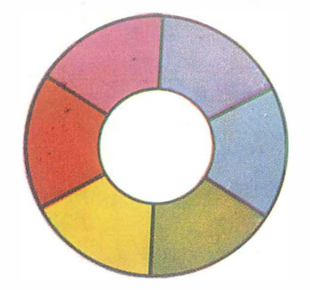


Bild 8.41. Farbenmikrofotografie I

Der Farbenkreis
Komplementärfarben liegen gegenüber

Farbtemperatur und Farbfilm

Farbfilme werden neben einer Angabe ihrer relativen Lichtempfindlichkeit mit der Beleuchtungsart gekennzeichnet, auf die das Material abgestimmt ist. Dazu werden die Bezeichnungen „für Tageslicht" und „für Kunstlicht" angewendet. Tageslichtfarbfilme werden in der Regel auf eine Farbtemperatur von 5500 K, Kunstlichtfarbfilme auf eine solche von 3200 K abgestimmt.

Zur Kennzeichnung der Farbtemperatur und der Filterwirkung wurde das mired-System eingeführt. Die Umwandlung einer Farbtemperatur in das mired-System geschieht nach der Beziehung

$$T_{\mathrm{F/mired}} = \frac{10^6}{T_{\mathrm{F/K}}} \qquad (8.15)$$

T in Kelvin.

In der Praxis wird meist mit dem dekamired-Wert gearbeitet:

1 dekamired = 10 mired,

folglich

$$T_{\mathrm{F/dekamired}} = \frac{10^5}{T_{\mathrm{F/K}}} \qquad (8.16)$$

Die dekamired-Werte der beiden Farbfilmtypen sind

Tageslichtfilm	5500 K	18,2 dekamired
Kunstlichtfilm	3200 K	31,2 dekamired

Eine abweichende Abstimmung weist das Polacolor-Material auf, das auf eine Farbtemperatur von 6250 K entsprechend 16 dekamired abgestimmt ist.

Tageslichtfarbfilm wird in der Mikrofotografie bei Fluoreszenzaufnahmen und bei Verwendung von Lichtquellen mit tageslichtähnlichem Spektrum (Xenonlampe, Elektronenblitz) benutzt. Tageslichtfarbfilm ist auch dann zu verwenden, wenn die Mikroskopbeleuchtung durch ein Lichtfilter auf Tageslichtcharakter gebracht worden ist, wie das in der Polarisationsmikroskopie die Regel ist. Werden zur Beleuchtung des Objekts Mikroskopierleuchten mit Glühlampen eingesetzt, dann ist Kunstlichtfilm erforderlich. Beispiele dazu zeigt Bild 8.41.

Konversionsfilter

Als zulässige Abweichung der Beleuchtung von der Abstimmfarbtemperatur des Farbfilmmaterials kann bei einem auf 5500 K abgestimmten Umkehr-Tageslichtfilm ein Farbtemperaturbereich von etwa 5200 bis 5800 K (entsprechend 19,2 bis 17,2 dekamired), bei einem auf 3200 K abgestimmten Umkehr-Kunstlichtfilm ein Farbtemperaturbereich von etwa 3100 bis 3300 K (entsprechend 32,3 bis 30,3 dekamired) angesehen werden [546]. Die Toleranz beträgt in beiden Fällen etwa ± 1 dekamired. Diese Toleranz ist bei den einzelnen Farbfilmfabrikaten verschieden und außerdem vom Farbenwahrnehmungsvermögen des Betrachters abhängig.

Eine Abweichung der Aufnahmebeleuchtung von der Abstimmung des Farbfilmtyps kann im Color-Negativ/Positivprozeß durch entsprechende Kopierfilterung ausgeglichen werden, bei Farb-Umkehrfilmen muß das bereits bei der Aufnahme geschehen. Dazu dienen Konversionsfilter.

Konversionsfilter werden mit dem Betrag in dekamired gekennzeichnet, um den sie die Farbtemperatur der Beleuchtung verschieben, wobei der Kennbuchstabe B eine Verschiebung nach Blau und damit zu den höheren Farbtemperaturen hin und R eine Verschiebung nach Rot zu den niedrigeren Farbtemperaturen anzeigt. Das für die Aufnahme notwendige Konversionsfilter wird nach folgender einfachen Gleichung errechnet:

Film-dekamired-Wert − Licht-dekamired-Wert
= Filter-dekamired-Wert. (8.17)

Soll z.B. eine Mikroaufnahme auf Kunstlicht-Umkehrfilm 3200 K (entsprechend 31,2 dekamired) aufgenommen werden, und wird dazu als Lichtquelle eine Glühlampe benutzt, deren Farbtemperatur 3000 K (entsprechend 33,3 dekamired) beträgt, dann muß ein Konversionsfilter benutzt werden, dessen dekamired-Wert 31,2 − 33,3 = −2,1 dekamired beträgt. Der dekamired-Wert hat hier ein negatives Vorzeichen. Dieses zeigt an, daß ein B-Filter zur Erhöhung der Farbtemperatur benutzt werden muß. Ergibt die Differenz aus Film- und Licht-dekamired-Wert einen Zahlenwert mit positivem Vorzeichen, dann ist ein R-Filter erforderlich.

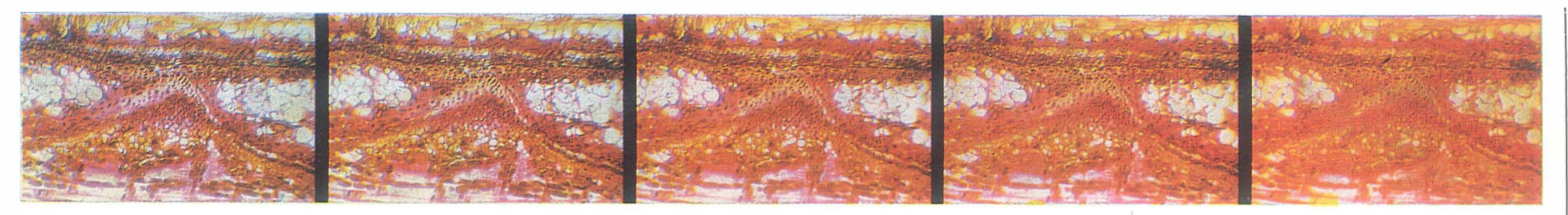
Um einen genauen Verschiebungswert zu erreichen, können die Konversionsfilter kombiniert werden, wobei sich die dekamired-Werte der einzelnen Filter addieren.

Der Einfluß der Betriebsspannung der Glühlampe auf die Farbenwiedergabe sowie die praktische Bestimmung des Konversionsfilterwerts sind im Bild 8.42 dargestellt.

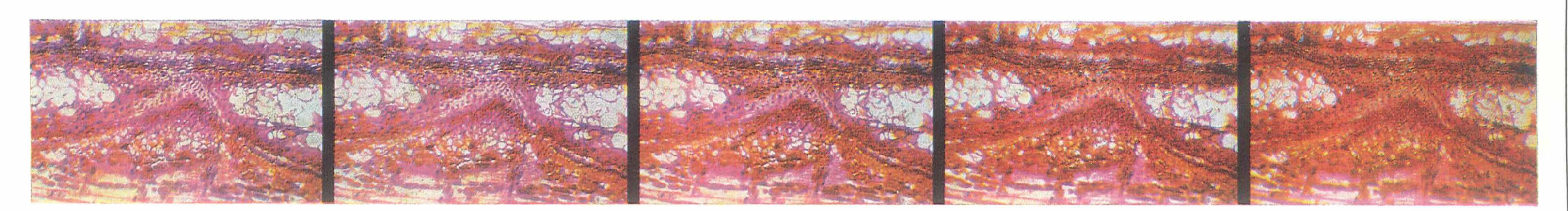
Farbenverschiebungen

Die Eigenfärbung der optischen Systeme verschiebt – wenn auch in geringem Maße – die Farbtemperatur ebenfalls. Das kann durch Testaufnahmen festgestellt und nach dem Ergebnis kompensiert werden.

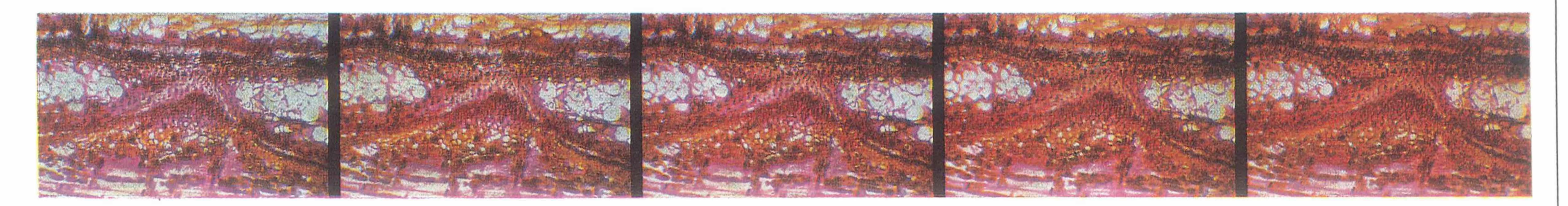
Weiter nehmen auch der Schwarzschild- und der UKZ-Effekt Einfluß auf die Farbenwiedergabe.



Konversionsfilterangleichung eines Tageslichtfarbfilms an Kunstlichtbeleuchtung:
ohne Filter – B 9 – B 15 – B 21 – B 27



Einfluß der Betriebsspannung auf die Farbtemperatur der Glühlampe und damit
die Farbenwiedergabe bei Aufnahmen auf Kunstlichtfilm:
4 Volt – 5 Volt – 6 Volt –7 Volt – 8 Volt



Konversionsfilterbestimmung für eine Farbaufnahme auf Kunstlichtfilm
bei Kunstlichtcharakter der Beleuchtung zum Ausgleich geringer Abweichungen
der Farbtemperatur von der Farbfilmabstimmung:
R 6 – R 3 – ohne Filter – B 3 – B 6

Bild 8.42. Farbenmikrofotografie II

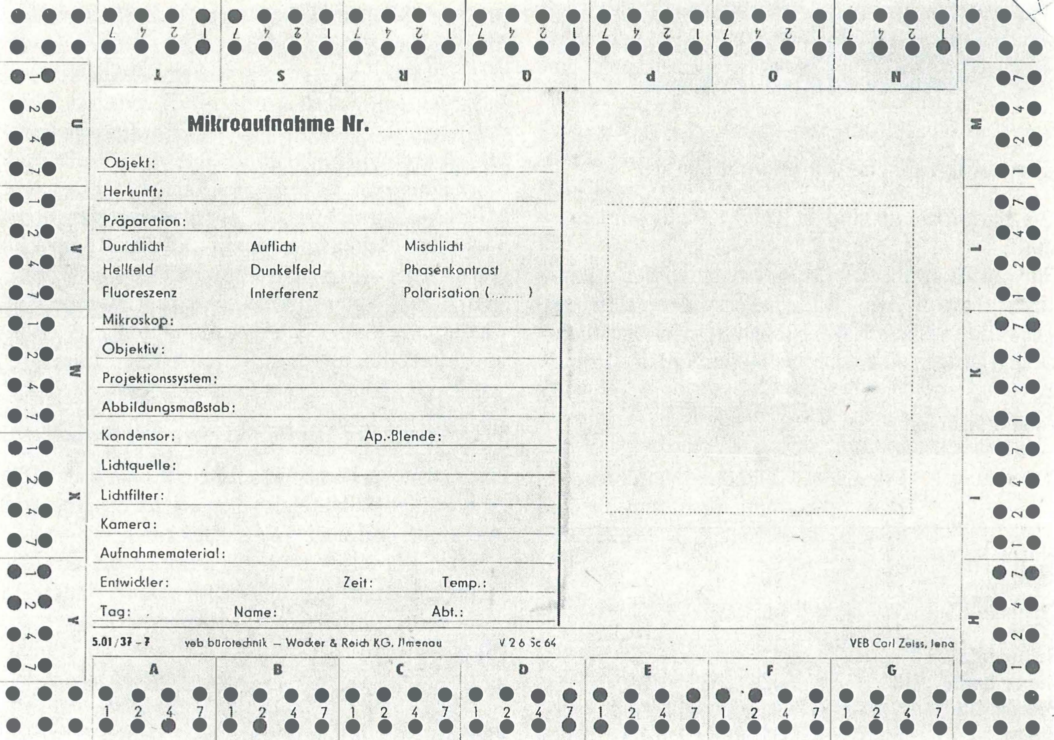
Beide wirken auf die einzelnen Farbschichten verschieden. Während Tageslicht-Umkehrfilm auf eine Belichtungszeit von 1/50 s neutral abgestimmt ist, werden Kunstlicht-Umkehrfarbfilme meist auf eine Belichtungszeit von 1/2 s neutral abgestimmt. Abweichungen um das 20fache nach oben oder unten stören das Farbgleichgewicht nicht. Durch den Schwarzschild-Effekt tritt eine bei verschiedenen Farbfilmmaterialen unterschiedliche Farbenverschiebung auf, die in der Regel nach Gelb/Gelbgrün und durch den UKZ-Effekt nach Purpur verläuft. Beiden Verschiebungen kann bei der Aufnahme durch ein Kompensationsfilter (wie man sie zur Farbsteuerung im Color-Negativ/Positivprozeß verwendet) entgegengewirkt werden. Darüber hinaus sind spezielle Farbfilmtypen im Handel, die auf eine Verwendung bei langen (L) und sehr kurzen (S) Belichtungszeiten abgestimmt sind.

8.2.8. Arbeitsgänge bei der Anfertigung mikrofotografischer Aufnahmen

Unabhängig von dem zur Mikrofotografie benutzten Gerät – über dessen spezielle Handhabung die zugehörige Bedienungsanleitung des Herstellers informiert –, sind die Arbeitsgänge bei der Anfertigung einer mikrofotografischen Aufnahme:

1. Subjektive Einstellung des Mikroskops unter Anwendung des für das darzustellende Objekt optimalen Beleuchtungsverfahrens. Für das Objekt ist dabei u. U. eine auf die Belange der fotografischen Bildwiedergabe zugeschnittene Präparier- und Färbetechnik anzuwenden;
2. Umstellung des Mikroskops zur Bildwiedergabe und Wahl des Bildausschnitts unter Beachtung der Regel des förderlichen Abbildungsmaßstabs für das Endbild;
3. Auswahl eines Lichtfilters, und zwar bei Schwarzweißaufnahmen unter Beachtung der Objektfarben und der Farbenempfindlichkeit des Aufnahmematerials, bei Farbaufnahmen dagegen unter Beachtung der Farbtemperatur der Lichtquelle und des Farbfilmtyps;
4. Bestimmung der Belichtungszeit bzw. Einstellung der Belichtungsautomatik auf die Lichtempfindlichkeit des Aufnahmematerials und dessen Entwicklungsbedingungen;
5. Belichtung der Aufnahme;

Bild 8.43. Aufnahmeprotokoll: Beispiel einer Anordnung der Aufnahmedaten auf Kerblochkarte



Mikroaufnahme Nr. ....

Objekt:
Herkunft:
Präparation:
Durchlicht Auflicht Mischlicht
Hellfeld Dunkelfeld Phasenkontrast
Fluoreszenz Interferenz Polarisation (........)
Mikroskop:
Objektiv:
Projektionssystem:
Abbildungsmaßstab:
Kondensor: Ap.-Blende:
Lichtquelle:
Lichtfilter:
Kamera:
Aufnahmematerial:
Entwickler: Zeit: Temp.:
Tag: Name: Abt.:

5.01/37-7 veb bürotechnik – Wacker & Reich KG. Ilmenau V 2 6 Sc 64 VEB Carl Zeiss, Jena

A B C D E F G
1 2 4 7

6. Anfertigung des Aufnahmeprotokolls;
7. Durchführung des Negativ/Positivprozesses bzw. der Umkehrentwicklung.

8.2.8.1. Aufnahmeprotokoll

Abschluß einer jeden mikrofotografischen Aufnahme ist die Anfertigung eines Aufnahmeprotokolls, das alle wesentlichen der Aufnahme zugrunde liegenden technischen Daten enthalten sollte. Das Protokoll kann entweder in Buchform – wobei die Aufnahmen in chronologischer Reihenfolge verzeichnet sind – oder auf Karteikarten angefertigt werden.

Das Muster einer Karteikarte für mikrofotografische Aufnahmen wird im Bild 8.43 gezeigt. Dabei handelt es sich um eine auf Kerblochkarten gedruckte Protokollkarte, die die Vorteile des Lochkartenverfahrens auch auf die mikrofotografische Labortechnik zu übertragen gestattet.

8.3. Mikrokinematografie

Das Bildwiedergabeverfahren Mikrokinematografie dient zur Registrierung und Erforschung von Bewegungsabläufen an mikroskopischen Objekten. Darüber hinaus ist die Mikrokinematografie ein für Demonstrations- und Lehrzwecke vielfach unentbehrliches Hilfsmittel.

8.3.1. Kinematografische Aufnahmeformate

Die Kinoformate sind in Tafel 8.9 zusammengestellt.

Für die Auswahl des Filmformats bei der mikrokinematografischen Bildwiedergabe spielen der Verwendungszweck des Films und wirtschaftliche Überlegungen eine wichtige Rolle. Soll das Ergebnis der Untersuchung lediglich der Registrierung und Auswertung des Bewegungsvorgangs als solchem dienen, wird man in manchen Fällen bereits mit 8-mm-, in der Mehrzahl der Fälle jedoch mit 16-mm-Schmalfilm auskommen. Soll dagegen das Ergebnis der Untersuchung einer größeren Betrachteranzahl zugänglich gemacht werden, dann ist die Verwendung des 16-mm-Schmalfilms oder des 35-mm-Normalfilms notwendig. Dem Normalfilm 35 mm ist der Vorzug zu geben, wenn es auf den Informationsgehalt des Einzelbilds ankommt. Geht man von der Fläche des Einzelbilds aus und legt dabei einen Punktabstand von 10 μm zugrunde [555], dann verhält sich die Anzahl der Bildpunkte bei Schmalfilm 8 mm: Schmalfilm 16 mm: Normalfilm 35 mm wie 1 : 4,5 : 15.

Eine weitere Frage ist oftmals die Anzahl der erforderlichen Kopien. Bei 8-mm-Filmaufnahmen wird ausschließlich, bei 16-mm-Filmaufnahmen überwiegend Umkehrmaterial benutzt. Das Verfahren führt zu einem Unikat; Kontraständerungen im Entwicklungsprozeß sind bei Umkehrentwicklung kaum möglich. Der 35-mm-Film bietet dagegen durch den dabei stets angewendeten Negativ/Positivprozeß die Möglichkeit einer Kontraständerung in großem Umfang. Die Schwierigkeiten der Normalfilmvorführung, z.B. auf wissenschaftlichen Tagungen, kann durch die Umkopierung des 35-mm-Negativs zu einem 16-mm-Positiv leicht umgangen werden.

Tafel 8.9. Kinoformate

Benennung	Filmbreite mm	Bildhöhe mm	Bildbreite mm
Normalfilm 35 mm	35	16	22
Schmalfilm 16 mm	16	7,5	10,3
Schmalfilm Super 8 mm	8	4,2	5,9
Schmalfilm 8 mm	8	3,6	4,9

8.3.2. Optische Anpassung der Laufbildkamera an das Mikroskop

Mikrokinoeinrichtungen werden in der Regel nach dem Baukastenprinzip aufgebaut und können so jeder Aufgabenstellung angepaßt werden. Zum Zweck einer mikrokinematografischen Bildwiedergabe kann die Verbindung von Mikroskop und Laufbildkamera auf zwei Arten erfolgen.

8.3.2.1. Verwendung der Laufbildkamera mit Fotoobjektiv

Der Geräteaufbau ist aus Bild 8.45 ersichtlich. Der Abbildungsmaßstab des Negativs errechnet sich in diesem Fall nach Gl. (8.4), wobei

$$p_{\text{Filmkamera}} = \frac{f_{\text{Fotoobjektiv}}}{250} \tag{8.18}$$

ist, so daß Gl. (8.4) in

$$M_{\text{Filmbild}} = M_{\text{Objektiv}} V_{\text{Okular}} \frac{f_{\text{Fotoobjektiv}}}{250} \tag{8.19}$$

umgeformt werden kann.

8.3.2.2. Verwendung der Laufbildkamera ohne Fotoobjektiv

In Analogie zu den übrigen Bildwiedergabeverfahren sollte auch in der Mikrokinematografie der Bilderzeugung durch das Mikroskop allein der Vorzug gegeben werden. Es hat sich dabei als nützlich erwiesen, einen der Aufsetzkamera weitgehend entsprechenden Aufbau mit einer optischen Kameralänge von $k = 125$ mm zu verwenden. Im Bild 8.44 wird eine Geräteanordnung gezeigt, wie sie mit einfachen, handelsüblichen Mitteln aufgebaut werden kann. Der Abbildungsmaßstab des Negativs errechnet sich bei solchen Anordnungen nach Gl. (8.7). Wenn die Bildebene der Laufbildkamera an den Ort der Bildebene der Aufsetzkamera gebracht wird, ist $p_{\text{Kameraansatz}} = 1$. Bei Verwendung der mf-Grundkörper des VEB Carl Zeiss JENA liegt die Bildebene 71,15 mm über der Schnellwechsleroberkante des Grundkörpers.

Bei der Wahl des Projektiv-Maßstabs bzw. der Okular-Lupenvergrößerung sollten zwei Überlegungen angestellt werden. Diese betreffen einmal die Einhaltung des förderlichen Abbildungsmaßstabs für das Endbild (s. Abschn. 8.2.4.5.) und zum anderen die Größe des bei der Filmaufnahme erfaßten Objektfeldanteils. Nicht nur der bei Beachtung der Regel des förderlichen Abbildungsmaßstabs sich ergebende relativ geringe, von der Laufbildkamera erfaßte Objektfeldanteil zwingt bei der Anfertigung mikrokinematografischer Aufnahmen oftmals zu einer erheblichen Unterschreitung des förderlichen Abbildungsmaßstabs, zu dieser Maßnahme wird man auch vielfach aus Gründen der Bildhelligkeit gezwungen.

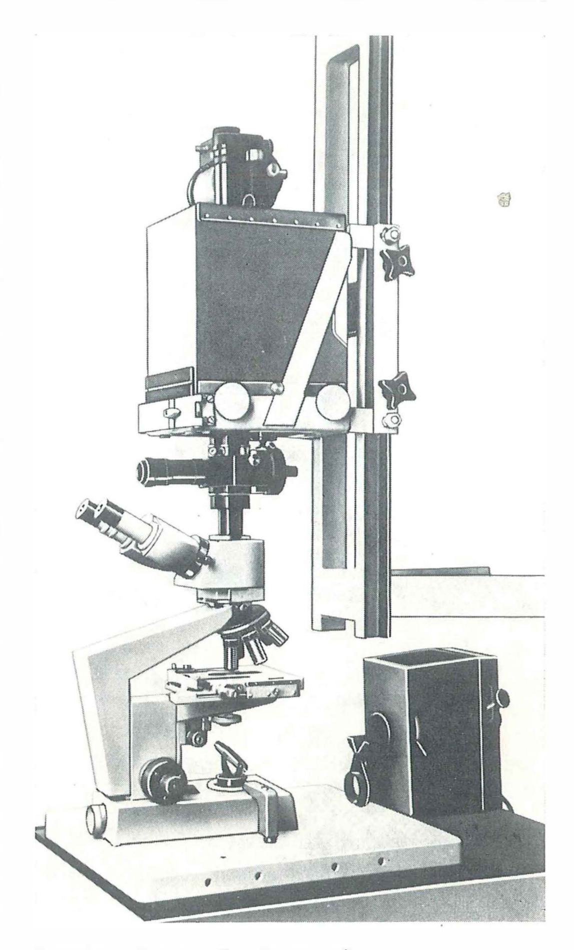


Bild 8.44. Prinzipieller Geräteaufbau für die Mikrokinematografie unter Verwendung von Bauteilen der Aufsetzkamera

8.3.3. Mechanische Verbindung von Laufbildkamera und Mikroskop

Wegen der beim Betrieb einer Laufbildkamera unvermeidlichen Vibrationen kommt der mechanischen Trennung von Laufbildkamera und Mikroskop eine besondere Bedeutung zu. Eine 35-mm-Normalfilmaufnahmekamera erfordert entweder den Aufbau auf einem Kinostativ, wobei in diesem Fall die optische Achse des mikroskopischen Abbildungsstrahlengangs in die Waagerechte gelenkt werden muß, oder aber die Anbringung der Kamera an einer vertikalen Wandschiene (Bild 8.44).

Im Fall der Verwendung einer leichten Schmalfilmkamera wird die Anordnung derselben gelegentlich auch mit einem Tischstativ vorgenommen (Bild 8.45).

Gleichgültig, zu welchem Aufbau man sich entschließt, es dürfen keine von der Kamera und ihren Antriebsaggregaten verursachten Schwingungen auf das Mikroskop übertragen werden. Die Verbindung muß außerdem lichtdicht sein.

8.3.4. Praxis der Mikrokinematografie

8.3.4.1. Belichtungszeit des Einzelbilds

Die Belichtungszeit des Einzelbilds kann bei Laufbildaufnahmen nicht frei gewählt werden. Sie ergibt sich vielmehr aus der Bildaufnahmefrequenz und der Hellsektoröffnung zu

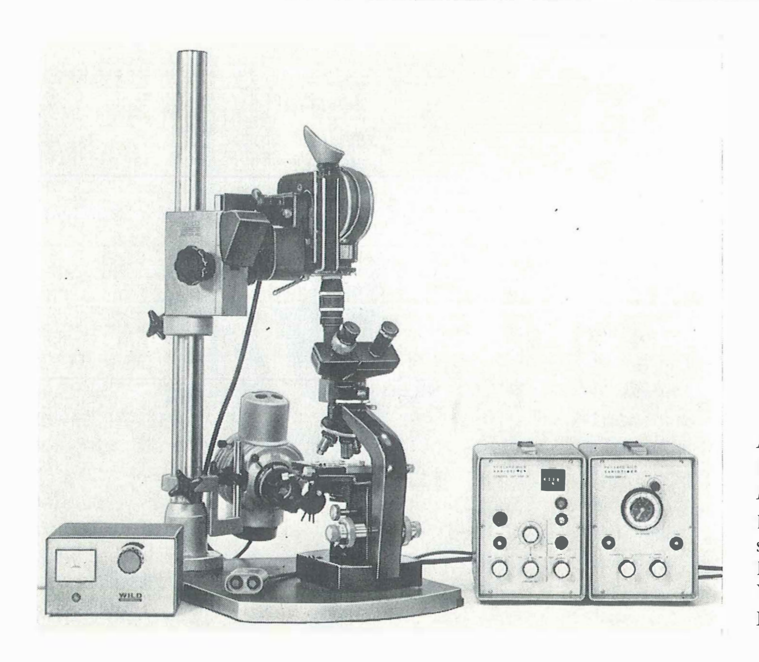


Bild 8.45
Wild-Zeitraffer-Mikrokino-Einrichtung 16 mm
Mikroskop M 20, Mehrzweckkamerastativ, Paillard-16-mm-Filmkamera, Paillard/Wild-Zeitraffer VARIOTIMER
Firma Wild, Heerbrugg, Werkfoto

Einzelbildbelichtungszeit

$$= \frac{\text{Hellsektoröffnung in }^\circ}{360^\circ \text{ Bildaufnahmefrequenz}} \text{ in s.} \qquad (8.20)$$

In Abhängigkeit von der Einzelbildbelichtungszeit und der Lichtempfindlichkeit des benutzten Filmmaterials ergibt sich eine bestimmte Beleuchtungsstärke in der Bildebene der mikrokinematografischen Einrichtung, die erreicht werden muß, um die Aufnahme überhaupt durchführen zu können.
Die Herabsetzung des Abbildungsmaßstabs durch Verwendung eines schwachen Projektivs oder eines Okulars geringer Lupenvergrößerung, allein zum Zweck der Steigerung der Beleuchtungsstärke in der Filmebene, ist dazu oftmals der einzige Weg. Daß dabei gleichzeitig noch ein größerer Bildausschnitt erfaßt wird, kann als zusätzlicher Gewinn dieser Maßnahme angesehen werden.

8.3.4.2.
Veränderung des Zeitmaßstabs

Soll ein Bewegungsablauf kinematografisch so wiedergegeben werden, daß bei der Vorführung des Films die Bewegung in ihrer natürlichen Geschwindigkeit abläuft, dann müssen Bildaufnahmefrequenz und Bildwiedergabefrequenz gleich sein. Das Verfahren wird als zeitgleiche Bildwiedergabe bezeichnet.

Eine Veränderung des Zeitmaßstabs tritt ein, wenn die Bildaufnahme mit einer von der Bildwiedergabefrequenz abweichenden Bildaufnahmefrequenz durchgeführt wird. Wenn dabei mit einer über der Bildwiedergabefrequenz liegenden Aufnahmebildfrequenz gearbeitet wird, erscheint der Vorgang bei der Bildwiedergabe in seinem Bewegungsablauf verlangsamt. Dieses Aufnahmeverfahren wird als Zeitdehnung bezeichnet.
Wird dagegen mit einer unter der Bildwiedergabefrequenz liegenden Bildaufnahmefrequenz gearbeitet, erscheint der Bewegungsablauf bei der Vorführung des Films beschleunigt, die Zeit wird verkürzt oder gerafft – man nennt das Verfahren deshalb Zeitraffung.
In der Mikrokinematografie kommen sowohl Filmaufnahmen zum Zweck einer zeitgleichen Bildwiedergabe als auch Zeitdehnung und Zeitraffung zur Anwendung.
Zur Errechnung des notwendigen Faktors für die Änderung des Zeitmaßstabs wird von den normalen Bildwiedergabefrequenzen der einzelnen Filmformate ausgegangen. Diese sind mit einigen weiteren für die Mikrokinematografie bei verändertem Zeitmaßstab wichtigen Daten in Tafel 8.10 zusammengestellt.
Aus der realen Zeitdauer des Vorgangs, der Zeitdauer, in der dieser Vorgang wiedergegeben werden soll, und der Bildwiedergabefrequenz kann die Bildaufnahmefrequenz errechnet werden.

Tafel 8.10. Für die Mikrokinematografie wichtige Daten der verschiedenen Filmformate

Filmart	Bildschritt mm	Normale Bildwiedergabe-frequenz Bilder/s	Anzahl der Einzelbilder auf 1 m Filmlänge Bilder/m	Filmlänge für 1 s Vorführung mit normaler Bildwiedergabefrequenz m
Normalfilm 35 mm	19,0	24	52,5	0,456
Schmalfilm 16 mm	7,62	24	131	0,183
Schmalfilm Super 8 mm	4,28	18	234	0,077
Schmalfilm 8 mm	3,81	16	261	0,061

Zwischen diesen Größen besteht der Zusammenhang

$$\frac{\text{Zeitdauer der Bildwiedergabe}}{\text{Zeitdauer des Vorgangs}} = \frac{\text{Bildaufnahmefrequenz}}{\text{Bildwiedergabefrequenz}}, \quad (8.21)$$

der die Größe der Bildaufnahmefrequenz als

$$\text{Bildaufnahmefrequenz} = \frac{\text{Zeitdauer der Bildwiedergabe} \times \times \text{Bildwiedergabefrequenz}}{\text{Zeitdauer des Vorgangs}} \quad (8.22)$$

zu bestimmen gestattet.

Bei der Wiedergabe des Films kann der besseren Verständlichkeit halber der Zeitmaßstab angegeben werden. Dieser kann als

$$\text{Zeitmaßstab} = \frac{\text{Zeitdauer des Vorgangs}}{\text{Zeitdauer der Wiedergabe}} \quad (8.23)$$

definiert werden.

In Analogie zum Abbildungsmaßstab sagt dabei die Angabe... : 1 aus, daß die Bewegungsgeschwindigkeit „vergrößert", der Bewegungsablauf also beschleunigt wiedergegeben wird, und weist damit auf eine bei der Aufnahme vorgenommene Zeitraffung hin.

Umgekehrt deutet die Angabe 1 : ... auf eine Verkleinerung der Bewegungsgeschwindigkeit, also auf einen verlangsamt wiedergegebenen Bewegungsablauf und damit auf eine durch die Aufnahme mit erhöhter Bildfrequenz vorgenommene Zeitdehnung hin.

8.3.4.3. Zeitraffermikrokinematografie

Bei Zeitrafferaufnahmen ändert sich am Aufbau der mikrokinematografischen Einrichtung lediglich der Kameraantrieb. Anstelle des Kameramotors wird ein Einzelbildantrieb mit Zeitgeber benötigt, für den sich die Bezeichnung Zeitraffer eingebürgert hat (Bild 8.45).

Im allgemeinen kann bei Zeitrafferaufnahmen zwischen zwei Antriebsarten der Kamera unterschieden werden: dem kontinuierlichen und dem intermittierenden Antrieb. Bei kontinuierlichem Kameraantrieb läuft die Antriebswelle der Kamera stetig, sie muß zur Erreichung der notwendigen Aufnahmebildfrequenz entsprechend untersetzt angetrieben werden. Diese Antriebsuntersetzung kann nicht beliebig weit getrieben werden, wenngleich dies zum Erzielen einer langen Einzelbildbelichtungszeit oftmals wünschenswert erscheint. Die Grenze dieser Antriebsart wird vom Aufnahmeobjekt, von seiner Bewegungsgeschwindigkeit, dem Abbildungsmaßstab der Aufnahme und damit letztlich von der Wegstrecke eines Objektpunkts in der Bildebene während der Belichtung bestimmt. Diese Strecke darf den Bereich der zulässigen Unschärfe nicht überschreiten.

Die zweite Antriebsart der Filmkamera bei Zeitrafferaufnahmen besteht in einem intermittierenden Antrieb. In mehr oder weniger großen Zeitabständen wird dabei die Kamera vom Zeitraffer um ein Einzelbild geschaltet.

Führt bei Zeitrafferaufnahmen die Errechnung der Bildaufnahmefrequenz nach Gl. (8.22) zu Werten, die kleiner als 1 Bild je s sind, kann mit dem Kehrwert der Bildaufnahmefrequenz gerechnet werden, der auch als Einzelbildabstand oder als Aufnahmebildfolgezeit bezeichnet wird. In diesem Fall ist

$$\text{Einzelbildabstand} = \frac{\text{Zeitdauer des Vorgangs}}{\text{Bildwiedergabefrequenz} \times \times \text{Zeitdauer der Bildwiedergabe}}. \quad (8.24)$$

Die Wahl des Einzelbildabstands bereitet dann Schwierigkeiten, wenn gleichzeitig mehrere Bewegungsabläufe unterschiedlicher Geschwindigkeit im Bildfeld stattfinden. Hierbei muß die Auf-

nahme auf den interessierenden Bewegungsablauf zugeschnitten und in Kauf genommen werden, daß andere Bewegungsabläufe verzerrt wiedergegeben werden.

8.3.4.4. Vorbereitung und Aufnahme

Wie kein anderes Bildwiedergabeverfahren der Mikroskopie erfordert die mikrokinematografische Wiedergabe eine äußerst intensive und sorgfältige Vorbereitung. Der Einsatz der Laufbildkamera setzt genaue Kenntnisse des Objekts und seines Verhaltens voraus. Besonders muß die Reaktion des Objekts auf die zur Mikrokinematografie erforderliche intensive Beleuchtung festgestellt werden. Unter Umständen wird davon die Wahl des Filmformats und des Filmmaterials entscheidend beeinflußt. Durch Kontrollversuche und mikrokinegrafische Aufnahmen muß der genaue Bewegungsablauf festgestellt und daraus der Zeitmaßstab für die mikrokinematografische Aufnahme abgeleitet werden.
Die kinematografische Aufnahme selbst bereitet danach keine Schwierigkeiten und ist nicht komplizierter als eine mikrofotografische Aufnahme.

8.3.4.5. Filmmaterial und Lichtfilter

Für die Wahl des Filmmaterials hinsichtlich Lichtempfindlichkeit und Gradation gelten die im Abschn. 8.2.7. bereits genannten Grundsätze. Zur Kinematografie können oftmals höherempfindliche und damit grobkörnigere Materialien eingesetzt werden, da das Korn bei der Laufbildprojektion weit weniger störend empfunden wird als bei einer fotografischen Einzelbildaufnahme. Bei der Wahl eines Kontrastfilters ergeben sich meist insofern Einschränkungen, als der die Belichtungszeit verlängernde Filterfaktor eine Erhöhung der Beleuchtungsstärke nach sich zieht, die wiederum nicht in jedem Fall vom Objekt vertragen wird. In diesen Fällen sollte dem Negativ/Positivprozeß mit den dabei gegebenen Möglichkeiten der Kontraständerung durch Entwicklung zu einem höheren Gamma-Wert der Vorzug gegeben werden. Beispiele werden im Bild 8.46 gezeigt.

8.3.4.6. Auswertung der Filmaufnahmen

Zur Analyse der mikrokinematografisch registrierten Bewegungsvorgänge sind verschiedene Meß-

Bild 8.46. Mikrokinematografie
Beispiele zur Wahl des Filmmaterials und seiner Entwicklung bei Laufbildaufnahmen auf Normalfilm 35 mm

übliches Filmmaterial und normale Entwicklung (links)

Panchromatischer Bildnegativfilm, Entwicklung im Bildnegativentwickler

Einzelbilder aus dem Film ,,Der Axolotl und seine Entwicklung" (IFBT-Film T-HF 157 ... 159, wissenschaftliche Bearbeitung: Prof. Dr. G. Uschmann; Gestaltung und Aufnahmen: G. Weidel)

übliches Filmmaterial und Entwicklungsmodifikation (Mitte)

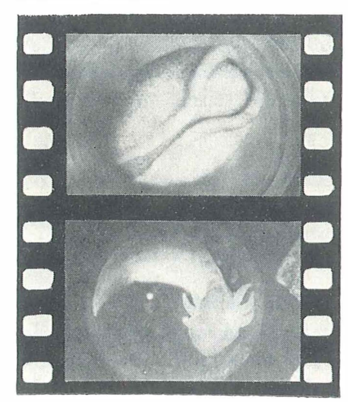
Panchromatischer Bildnegativfilm, Entwicklung im Tonnegativentwickler

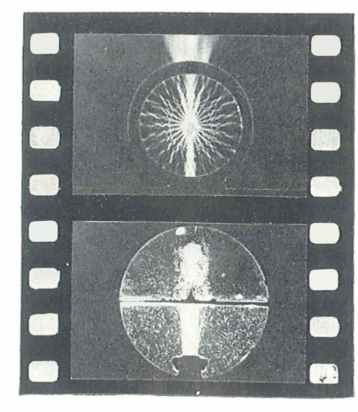
Einzelbilder aus dem Film ,,Ultraschallvorgänge im Schlierenbild" (IFBT-Film T-HF 210, wissenschaftliche Bearbeitung: H. Vosahlo; Gestaltung und Aufnahmen: G. Weidel)

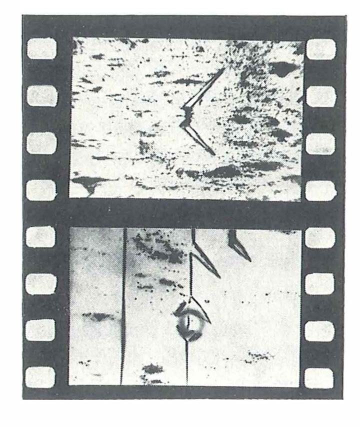
Aufnahme auf besonders hart arbeitendem Material (rechts)

Orthochromatischer Tonnegativfilm, Entwicklung im Bildnegativentwickler

Einzelbilder aus dem Film ,,Elementarvorgänge der Magnetisierung" (IFBT-Film T-HF 88, wissenschaftliche Bearbeitung: Dr. B. Elschner; Gestaltung und Aufnahmen: G. Weidel)







verfahren bekannt. Sie beruhen überwiegend auf einer Einzelbildprojektion des Laufbildstreifens. Dabei können Zeit-Weg-Kurven aufgenommen sowie zeitabhängige Flächenänderungen u.ä. erfaßt werden. Voraussetzung dazu ist die genaue Kenntnis des Einzelbildabstands, dessen Feststellung durch das Einbelichten einer Uhr oder von Zeitmarken erleichtert werden kann.
Filmaufnahmen zum Zweck der Demonstration müssen geschnitten und evtl. mit Zwischentiteln oder Kommentar versehen werden. Zur Unterstützung der Aussage eines solchen Lehrfilms werden gelegentlich auch Trickdarstellungen herangezogen, die entweder das Versuchsprinzip oder die Auswertung der Bewegungsanalyse in Form von grafischen Darstellungen zeigen.

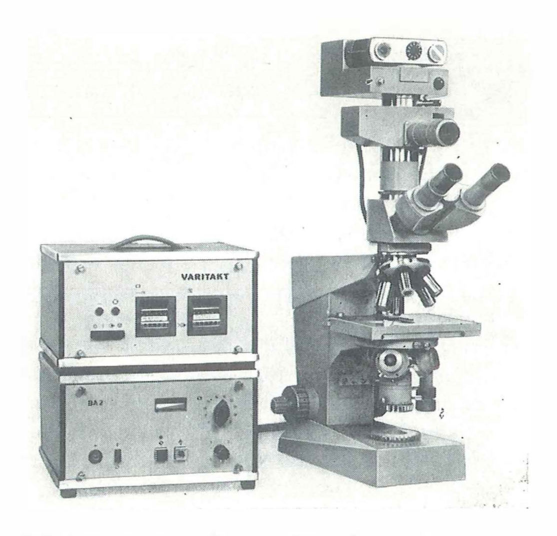


Bild 8.47. Geräteaufbau zur Mikrokinegrafie
Mikroskop AMPLIVAL mit automatischer Aufsetzkamera mf · matic und Zeitgeber VARITAKT
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

8.4. Mikrokinegrafie

Zur Informationsgewinnung über zeitabhängige Veränderungen am mikroskopischen Objekt mit Hilfe eines fotografischen Aufzeichnungsverfahrens ist die Anfertigung mikrofotografischer Aufnahmen mit definierten Bildabständen erforderlich. Die technische Entwicklung der Aufsetzkamera und des Kleinbild-Kameramikroskops in bezug auf die dabei erfolgte Automatisierung von Belichtung und Filmtransport ermöglichen den Ausbau der beiden genannten Geräte zur Mikrokinegrafie. Zur Anfertigung zeitgesteuerter Kleinbild-Serienaufnahmen ist noch ein Zeitgeber nötig, der die Aufnahmebildfolge steuert. Im Bild 8.47 wird ein Geräteaufbau zur Mikrokinegrafie unter Verwendung von Bauteilen der Aufsetzkamera, im Bild 8.48 mit einem Kleinbild-Kameramikroskop als Basis für diesen Aufbau gezeigt.
Der Zeitgeber löst die Belichtungsautomatik in wählbaren Zeitabständen aus, diese nach erfolgter Belichtung ihrerseits den automatischen Filmtransport, so daß beim Folgeimpuls des Zeitgebers die automatische Aufsetzkamera wieder aufnahmebereit ist. Am Bildabstandswähler des in den Bildern 8.47 und 8.48 gezeigten Zeitgebers können Aufnahmebildabstände von 1 bis 10^6 s stufenlos eingestellt werden. Zu beachten ist allerdings, daß der Aufnahmebildabstand größer sein muß als die Summe von Einzelbildbelich-

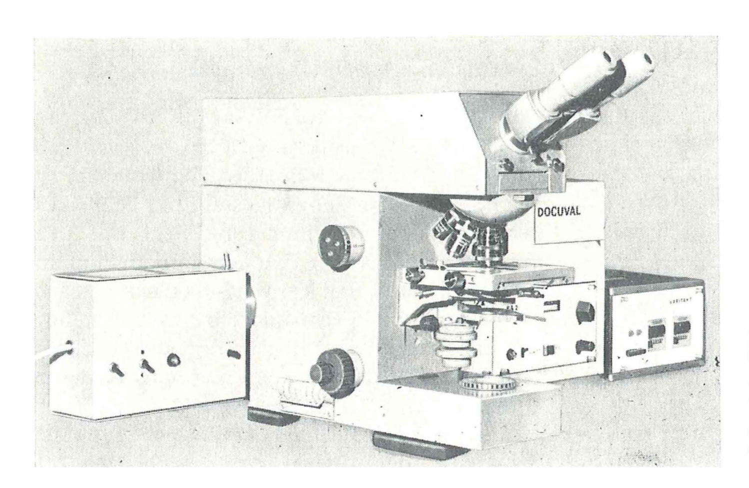


Bild 8.48
Mikrokinegrafie mit dem Fotomikroskop DOCUVAL
Zeitgeber VARITAKT, Blitzleuchte zur Mikrofotografie
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

tungszeit und Filmtransportdauer. An einem zweiten Wähler kann die Anzahl der gewünschten Bilder eingestellt werden, nach deren Erreichung der Zeitgeber selbsttätig abschaltet.
Als Lichtquelle für die Mikrokinegrafie ist eine Blitzleuchte besonders geeignet, da durch ihren Einsatz die Strahlungsbelastung des Objekts – vor allem bei großen Aufnahmebildabständen – erheblich herabgesetzt werden kann. Die erreichbare kürzeste Blitzfolge ist allerdings von Einfluß auf den minimalen Aufnahmebildabstand.
Im Prinzip können mikrokinegrafische Aufnahmen auch mit einer Laufbildkamera in Verbindung mit einem Zeitraffer angefertigt werden. Der wesentlich geringere Geräteaufwand sowie der gegenüber den Laufbild-Aufnahmeformaten größere Informationsgehalt sprechen aber zugunsten des Kleinbild-Aufnahmeformats.

8.5. Fernsehmikroskopie

Wenn im Zusammenhang mit den mikroskopischen Bildwiedergabeverfahren die Fernsehmikroskopie genannt wird, dann sind dabei die Aufnahme und Wiedergabe des von einem Mikroskop gelieferten Bilds mit Mitteln der Fernsehtechnik gemeint. Zweck des Verfahrens ist in diesem Fall allein die Demonstration des mikroskopischen Objekts für einen oder mehrere Beobachter.

8.5.1. Fernsehanlagen

Fernsehanlagen werden als Studioanlagen oder als Industriefernsehanlagen und in beiden Gruppen sowohl für Schwarzweiß- als auch für Farbwiedergabe hergestellt.
Wird zur Fernsehmikroskopie eine Studiokamera benutzt, ist die Lichtempfindlichkeit der Anlage derart hoch, daß hier von einer lichtschonenden Mikroskopie gesprochen werden kann. Der Aufwand ist aber erheblich, so daß für Zwecke der Fernsehmikroskopie als Demonstrationsmittel Industriefernsehanlagen zum Einsatz gelangen.

8.5.2. Aufbau eines Fernsehmikroskops mit Industriefernsehanlage

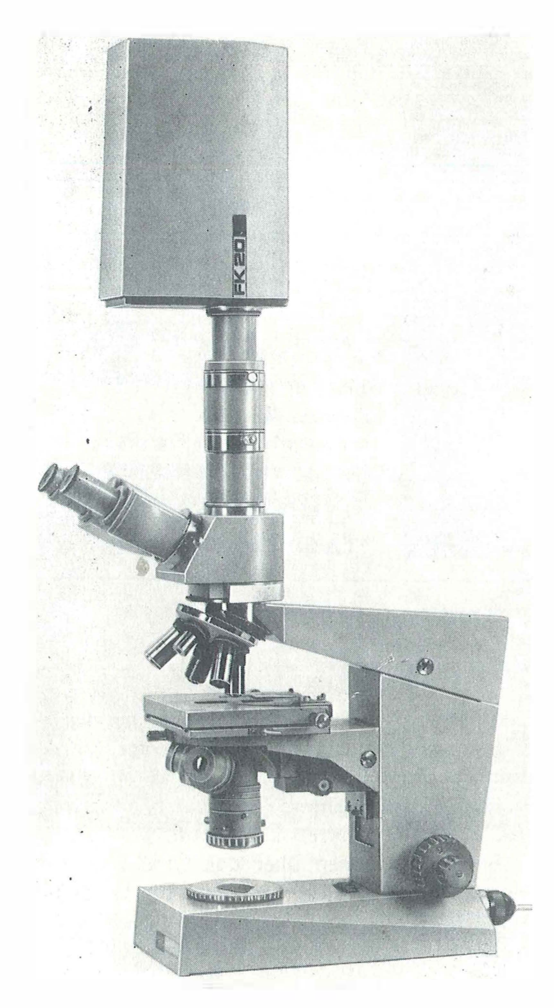
Bei der Auswahl einer Fernsehanlage zur Fernsehmikroskopie ist zunächst die erforderliche Betriebsanlage der Fernsehkamera zu beachten. Einige Hersteller lassen für die Kamera nur die horizontale Betriebslage zu. Wichtig ist ferner das Vorhandensein einer Lichtwertautomatik – darunter ist der automatische Ausgleich von Helligkeitsänderungen zu verstehen. Von Industriefernsehanlagen werden Helligkeitsänderungen in einem Bereich von etwa 1 : 250 automatisch kompensiert, so daß im Fall der Fernsehmikroskopie beim Wechsel der Objektiv-Maßstabszahl oder des Projektiv-Abbildungsmaßstabs keine Nachsteuerung erforderlich ist.
Für das zu Demonstrationen vor einem größeren Personenkreis bestimmte Fernsehmikroskop ist ferner wesentlich, daß an die Fernsehanlage mehrere Bildwiedergabegeräte angeschlossen werden können.

8.5.2.1. Optische und mechanische Anpassung der Fernsehkamera an das Mikroskop

Zur Fernsehmikroskopie kann im einfachsten Fall ein der mikrofotografischen Aufsetzkamera entsprechender Aufbau gewählt werden (Bild 8.49a). Durch die konstante optische Kameralänge ergibt jede Objektiv-Projektiv-Kombination dabei einen festen Abbildungsmaßstab und damit einen festliegenden Bildausschnitt. Ein Wechsel des Projektiv-Abbildungsmaßstabs erfordert bei diesem Aufbau die Abnahme der Fernsehkamera vom Mikroskop. Die Notwendigkeit des Projektivwechsels besteht nicht, wenn die Fernsehkamera an einem Mikroskop mit eingebautem Vergrößerungswechsler oder in Verbindung mit einem pankratischen Projektiv benutzt wird (Bild 8.49b).

8.5.3. Praxis der Fernsehmikroskopie

Die Variation des Projektiv-Maßstabs bzw. der Okular-Lupenvergrößerung ist bei vorgegebenem Objektiv das einzige Mittel der Einflußnahme auf den Endbild-Abbildungsmaßstab. Der Maßstabsfaktor der Fernseheinrichtung liegt mit dem Größenverhältnis von Fotokatode und Empfängerbildröhre fest. Bei Verwendung eines Fernsehempfängers mit 53-cm-Bildröhre in Verbindung mit einer Vidikonkamera beträgt dieser Faktor z. B. 37 ×. Die Größe des Fernsehbilds wiederum bestimmt den Betrachtungsabstand.
Fendler [556] gibt unter Berücksichtigung der Sehschärfe des Auges und der Zeilenanzahl



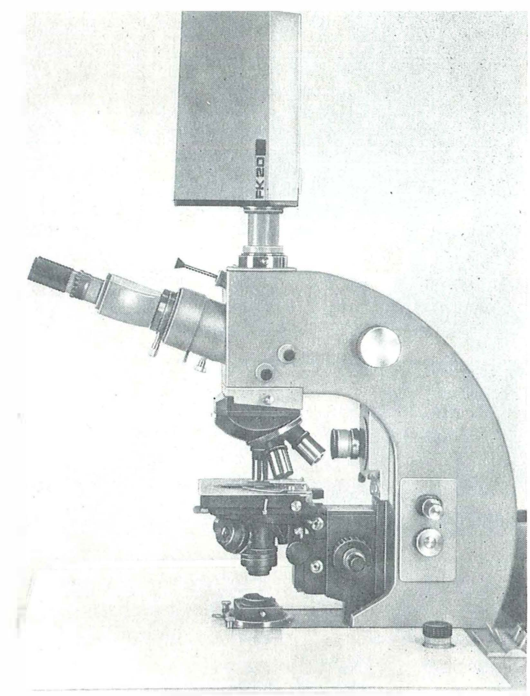


Bild 8.49. Geräteaufbauten zur Fernsehmikroskopie mit Industriefernsehkamera

Anordnung der Fernsehkamera (FK 20 des VEB Studiotechnik Berlin) als Aufsetzkamera

a) (links) mit mf-Projektiv;
b) (oben) mit pankratischem Projektiv

des Fernsehbilds folgende Betrachtungsabstände an:

43-cm-Bildröhre	1,90 m,
53-cm-Bildröhre	2,45 m,
61-cm-Bildröhre	3,00 m.

Unter Bezugnahme auf die maximale Betrachtungsentfernung für projizierte Diapositive kommt *Frenk* [557] zu annähernd gleichen Werten und nennt dabei noch

Fernsehprojektionsbild 1,5 m × 2 m	12 m,
Fernsehprojektionsbild 3 m × 4 m	24 m.

Geht man für die Wahl des Bildschirm-Abbildungsmaßstabs von der Regel eines förderlichen Abbildungsmaßstabs aus und legt diesen für den Fall der Verwendung eines Fernsehempfängers mit 53-cm-Bildröhre auf den genannten Betrachtungsabstand von 2,50 m aus, dann ergibt sich nach Gl. (8.8) für das Objektiv 100/1,25

$$M_{\text{förderlich}} = 1250 \frac{2500}{250} = 12\,500 : 1 .$$

Unter Berücksichtigung des Maßstabsfaktors der Fernsehanlage (37 ×) und der Objektiv-Maßstabszahl (100) beträgt der für die obere Grenze des förderlichen Abbildungsmaßstabs erforderliche Projektiv-Abbildungsmaßstab 3,2 : 1. Im Bild 8.50 ist das pankratische Projektiv der Fernseheinrichtung auf diesen Wert eingestellt – die Feinstruktur des mikroskopischen Objekts (Kieselalge Pleurosigma angulatum) ist einwandfrei wiedergegeben. Mit einem pankratischen

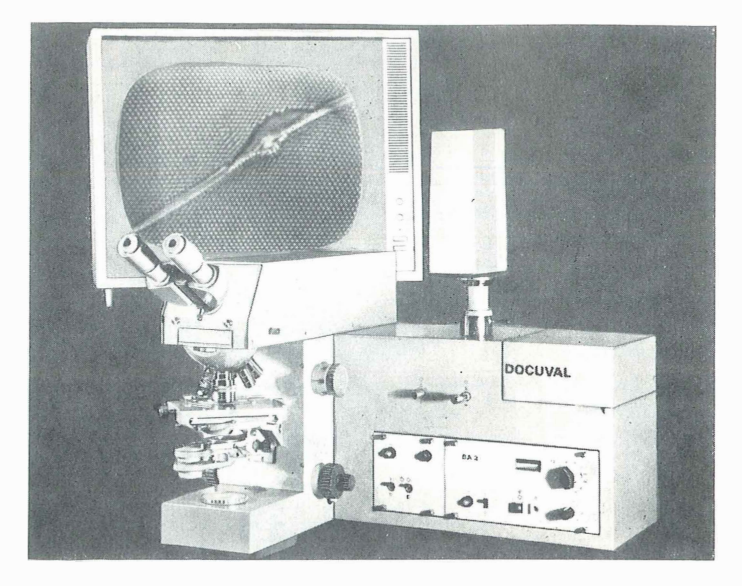


Bild 8.50
Fernsehmikroskop mit pankratischem Projektiv
Fotomikroskop DOCUVAL mit Fernsehkamera (FK 20 des VEB Studiotechnik Berlin)
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Projektiv kann der Bereich des förderlichen Abbildungsmaßstabs sowohl unterschritten als auch überschritten werden. Letzteres ist gelegentlich erforderlich, wenn Objektdetails so weit vergrößert werden müssen, daß sie auch aus größerer Entfernung noch erkannt werden können. Eine Unterschreitung wird notwendig, wenn zunächst eine Übersicht über das Objekt als Ganzes gegeben werden muß. Dabei gehen natürlich – durch die Zeilenstruktur des Fernsehbilds bedingt – die Objekteinzelheiten in weit größerem Maße verloren als z. B. bei der Mikro- oder Diapositivprojektion, wo ein Herantreten an das Projektionsbild wieder Einzelheiten erkennen lassen würde. Im Bild 8.51 wird der Einfluß der Zeilenstruktur auf das Endbild bei Unter- und Überschreitung des Bereichs des förderlichen Abbildungsmaßstabs gezeigt. Das Bild sollte aus einem Betrachtungsabstand von 6 × Bilddiagonale der Einzelbilder betrachtet werden. Der Bereich des förderlichen Abbildungsmaßstabs beträgt für das bei der Aufnahme des Bildbeispiels am Fernsehmikroskop benutzte Mikroskopobjektiv dann 1250 : 1 bis 2500 : 1. Bei einer Verkürzung des Betrachtungsabstands erweist sich, daß die Feinstruktur des Objekts – obwohl vom Mikroskopobjektiv aufgelöst – fernsehmikroskopisch nicht dargestellt werden kann. Bedingung für die Fernsehmikroskopie ist deshalb, das mikroskopische Objekt über die Zeilenstruktur des Fernsehbilds hinaus zu vergrößern und den Projektiv-Abbildungsmaßstab dieser Forderung entsprechend zu wählen.

8.6. Mikroprojektion

Die im Normalfall auf einen Betrachter beschränkte Beobachtung des mikroskopischen Objekts kann mit dem Bildwiedergabeverfahren Mikroprojektion auf mehrere Betrachter oder einen größeren Personenkreis ausgedehnt werden. Das ist bei Diskussionen über das Objekt oder zu dessen Demonstration vor allem für Lehr- und Ausbildungszwecke erforderlich.

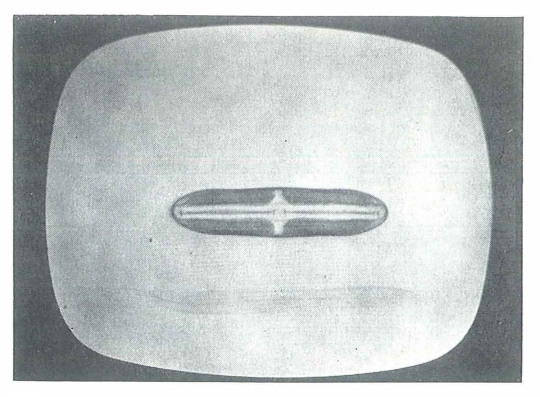
8.6.1. Projektionsverfahren

In der Mikroprojektion werden Aufprojektion und Rückprojektion zur Anwendung gebracht. Bei der Aufprojektion befinden sich Projektionsgerät und Betrachter auf der gleichen Seite der Bildwand. Bei der Rückprojektion wird eine transparente Bildwand verwendet; die Betrachter befinden sich auf der dem Projektionsgerät gegenüberliegenden Seite des Bildträgers. Das letztgenannte Verfahren hat den Vorteil, brillantere Bilder mit größerem Helligkeitsumfang zu liefern.

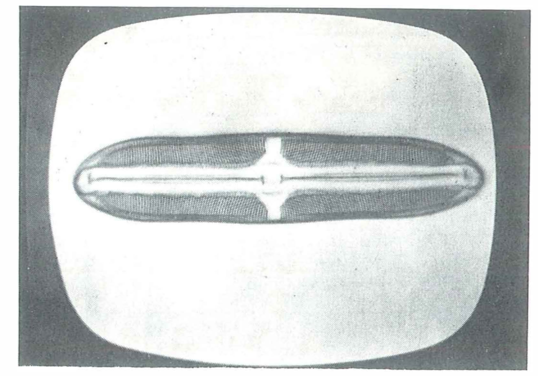
8.6.2. Geräte zur Mikroprojektion

8.6.2.1. Projektionsaufsatz

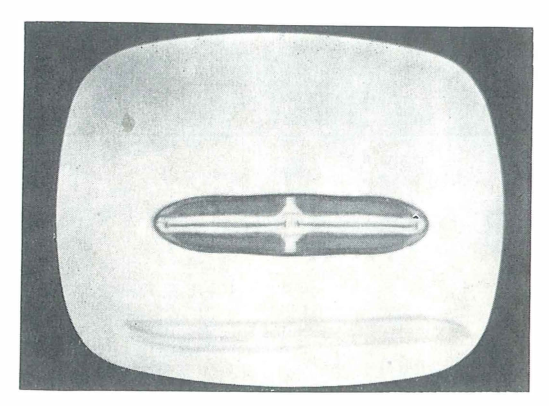
Bei Projektionsaufsätzen kommt das Verfahren der Rückprojektion zur Anwendung. Projektions-



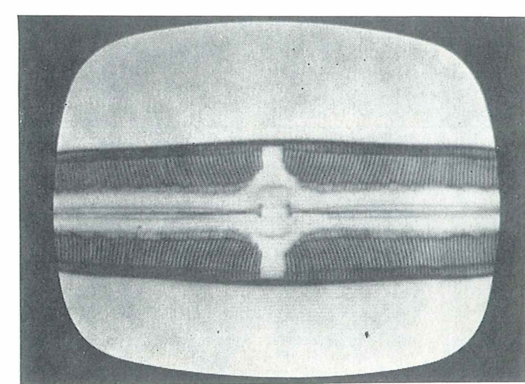
740 : 1



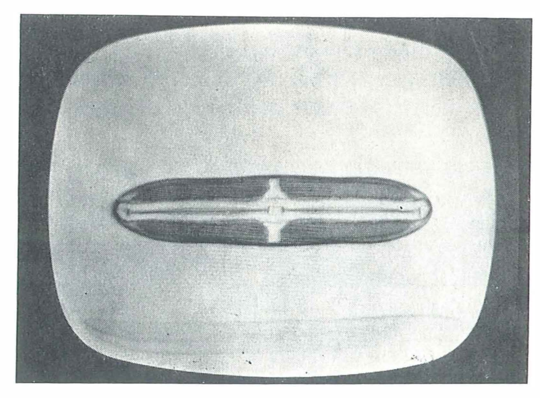
1480 : 1



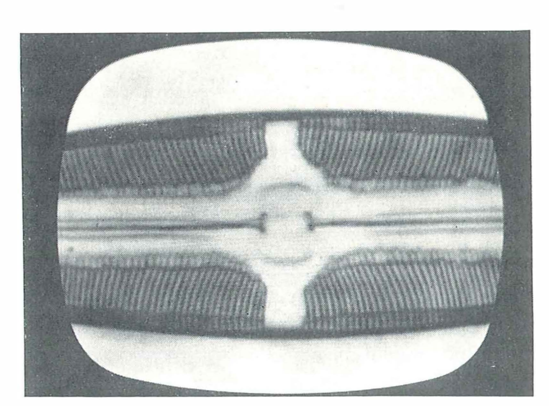
930 : 1



2300 : 1



1160 : 1



3700 : 1

Bild 8.51. Fernsehmikroskopie

Einfluß von Abbildungsmaßstab und Zeilenstruktur auf die Bildwiedergabe
Für die Betrachtung aus einer der 6fachen Bilddiagonale entsprechenden Entfernung liegt der „förderliche Abbildungsmaßstab" für das benutzte Mikroskopobjektiv zwischen 1500 : 1 und 3000 : 1

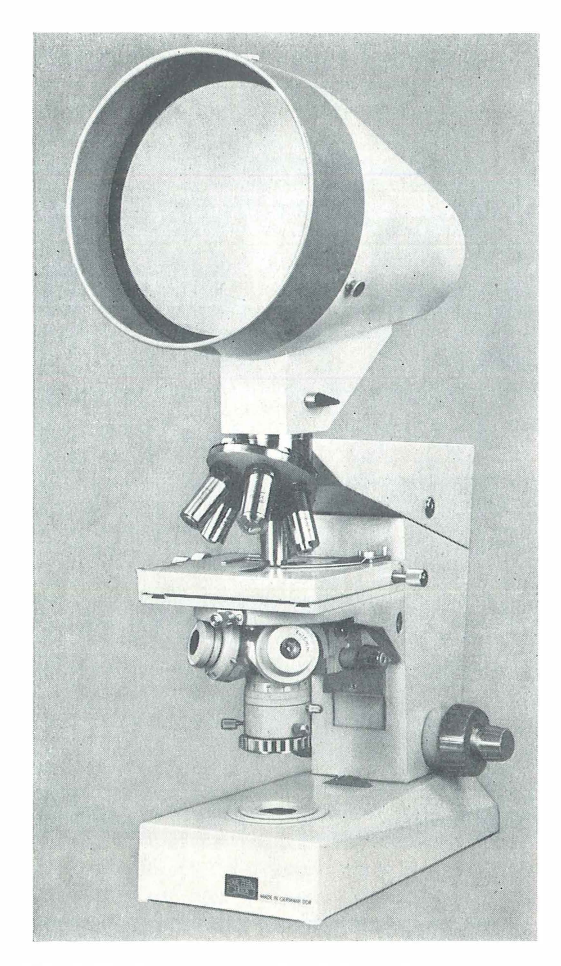


Bild 8.52. Anordnung des Projektionsaufsatzes auf dem Tubusträgerkopf

Mikroskop AMPLIVAL mit Demonstrationsaufsatz 10 ×

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

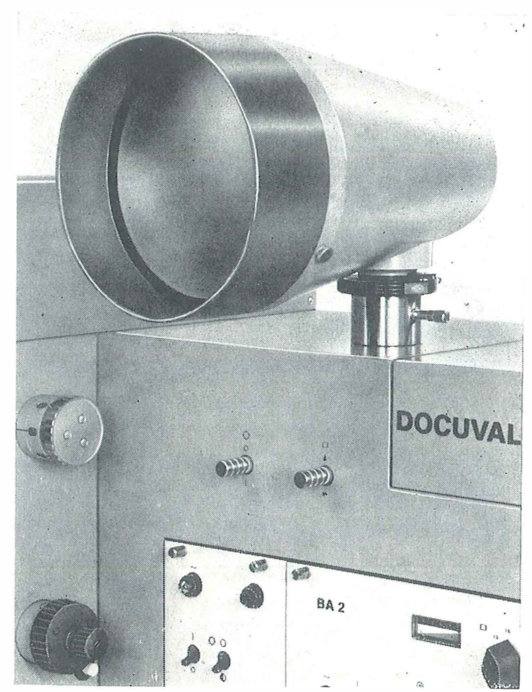


Bild 8.53. Anordnung des Projektionsaufsatzes auf dem Fotoausgang

Fotomikroskop DOCUVAL mit Demonstrationsaufsatz 4 : 1

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

aufsätze können auf zweierlei Weise an Mikroskope angepaßt werden. Bild 8.52 zeigt die Bauform eines Projektionsaufsatzes, der anstelle des Beobachtungstubus auf das Mikroskop gesetzt werden kann. Die zweite Anpassungsmöglichkeit beruht auf der optischen und mechanischen Ausbildung des Projektionsaufsatzes in der Art eines Kameraansatzes der Aufsetzkamera. In diesem Fall wird der Projektionsaufsatz auf den Fotoausgang des Mikroskops gesetzt, wie das z. B. im Bild 8.53 dargestellt ist. Im allgemeinen ergibt sich für jedes Mikroskopobjektiv ein fester Schirmbild-Abbildungsmaßstab, es sei denn, das Mikroskop ist mit einem Vergrößerungswechsler versehen.

Die Schirmbild-Durchmesser der Projektionsaufsätze betragen 160 bis 200 mm. Die Anzahl der Betrachter ist deshalb auf wenige Personen begrenzt.

Vielfach kann die Projektionsscheibe gegen einen Fotoeinsatz ausgewechselt werden. Mit einem Projektionsaufsatz können auch Messungen und Zählungen am Bild des mikroskopischen Objekts ausgeführt werden.

8.6.2.2. Mikroprojektionsgerät

Mikroprojektionsgeräte werden zur Projektion des Bilds eines mikroskopischen Objekts für eine größere Betrachteranzahl verwendet. Im allgemeinen kommt dabei das Verfahren der Aufprojektion zur Anwendung.

Ein aus der Kombination Mikroskop/Projektionsuntersatz gebildetes Mikroprojektionsgerät (Bild 8.54) gestattet die Verwendung des Mikroskops auch zur visuellen Beobachtung in der nicht zur Mikroprojektion verwendeten Zeit,

doch muß das Mikroprojektionsgerät dann jeweils neu aufgebaut und eingerichtet werden.
Ein spezielles Mikroprojektionsgerät kann dagegen von Haus aus für diesen Verwendungszweck ausgelegt werden. So ist das Mikroprojektionsgerät PICTOVAL des VEB Carl Zeiss JENA (Bild 8.55) den Erfordernissen der Mikroprojektion insofern optimal angepaßt, als jedem Objektiv ein Kondensor entsprechender Apertur zugeordnet ist.
Einen weiteren Schritt in dieser Richtung stellt die mechanische Kopplung von Objektiv und zugehörigem Kondensor dar.

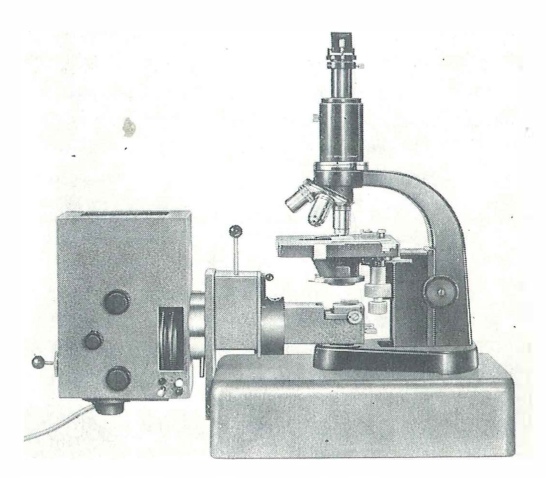


Bild 8.54. Mikroprojektionsgerät SM
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

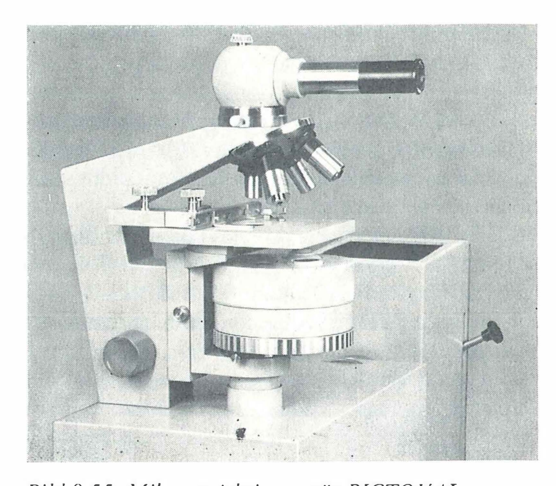


Bild 8.55. Mikroprojektionsgerät PICTOVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

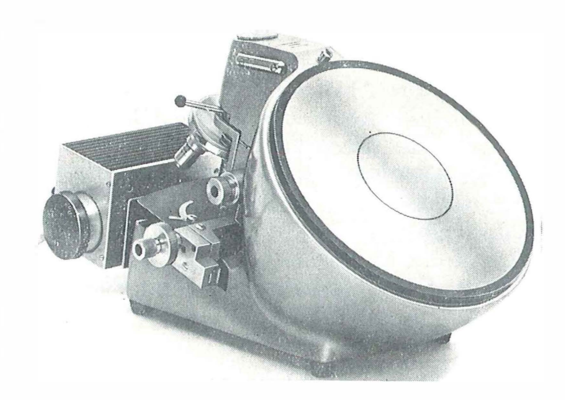


Bild 8.56. Projektionsmikroskop VISOPAN
Firma C. Reichert, Wien, Werkfoto

8.6.2.3. Projektionsmikroskop

Ein Projektionsmikroskop stellt die geschlossene Bauform eines Mikroskops mit einer Projektionsscheibe dar (Bild 8.56). Im Normalfall gelangt bei Projektionsmikroskopen das Verfahren der Rückprojektion zur Anwendung. Projektionsmikroskope dienen vorwiegend zur Durchführung von Zählungen und Messungen am mikroskopischen Objekt. Einige Meßverfahren erfordern dazu die Erreichung eines genormten Abbildungsmaßstabs.

8.6.3. Praxis der Mikroprojektion

8.6.3.1. Mikroprojektion mit Rückprojektion

Die für die Helligkeit des Projektionsbilds maßgebenden Größen sind bei den mit Rückprojektion arbeitenden Geräten vorgegeben.

Abbildungsmaßstab und Größe des projizierten Objektfelds

Das Projektionsbild läßt alle vom Mikroskop aufgelösten Objekteinzelheiten erkennen, wenn der Projektionsbild-Abbildungsmaßstab der Regel des förderlichen Abbildungsmaßstabs genügt. Die Einhaltung des förderlichen Abbildungsmaßstabs ist für die mit dem Rückprojektionsverfahren arbeitenden Geräte deshalb leicht zu realisieren, weil die Betrachtung des Projektionsbilds hier meist aus der Bezugssehweite 250 mm erfolgt. Der Maßstabsfaktor eines Projektionsaufsatzes bzw. eines Projektionsmikroskops kann unter dieser Voraussetzung leicht auf die Belange des förder-

lichen Abbildungsmaßstabs abgestimmt werden. Für Zwecke des Zählens und Messens ist zur Erhöhung der Ablesegenauigkeit eine geringe Überschreitung des förderlichen Abbildungsmaßstabs gelegentlich von Vorteil.
Für die Errechung des Projektionsbild-Abbildungsmaßstabs kann man von Gl. (8.3) ausgehen, die auch als

$$M_{\text{Projektionsbild}} = M_{\text{Objektiv}} V_{\text{Okular}} \frac{k}{250} \quad (8.25)$$

geschrieben werden kann.
Wenn man in dieser Gleichung das Produkt $V_{\text{Okular}}\ k/250$ als Projektionsfaktor $F_{\text{Projektion}}$ bezeichnet, ist

$$M_{\text{Projektionsbild}} = M_{\text{Objektiv}}\ F_{\text{Projektion}}. \quad (8.26)$$

So gesehen, gibt der Projektionsfaktor das Größenverhältnis von Projektionsbild und Zwischenbild an. Er kann auch als

$$F_{\text{Projektion}} = k/f_{\text{Okular}} \quad (8.27)$$

geschrieben werden. Der Vergleich zu Gl. (8.10) zeigt die Analogie zur einstufig vergrößernden Abbildung.

8.6.3.2. Mikroprojektion mit Aufprojektion

Die Realisierung einer projektionsmikroskopischen Bildwiedergabe für eine größere Betrachteranzahl ist oft mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Diese sind vorwiegend in der Forderung nach Erzielung einer ausreichenden Bildhelligkeit, der durch diese verursachten Strahlungsbelastung des Objekts und schließlich noch durch die Notwendigkeit eines der Regel eines förderlichen Abbildungsmaßstabs entsprechenden Projektionsbildmaßstabs dann begründet, wenn alle vom Mikroskop aufgelösten Strukturelemente auch bei der projektionsmikroskopischen Bildwiedergabe von allen Betrachtern erkannt werden sollen.

Mikroprojektion unter Beachtung des förderlichen Abbildungsmaßstabs

Durch die auf der Sehschärfe des Auges beruhenden Größe des förderlichen Abbildungsmaßstabs wird zunächst einmal die Wahl der Betrachtungsentfernung eingeschränkt. Sie sollte aus dieser Sicht so gewählt werden, daß der Abstand der letzten Sitzreihe möglichst den Wert des doppelten Abstands der ersten Sitzreihe nicht überschreitet. Dann kann der Abbildungsmaßstab des Projektionsbilds entweder für die erste Sitzreihe auf der Basis 1000 A_{Objektiv} oder für die letzte Sitzreihe auf der Basis 500 A_{Objektiv} errechnet werden – er nimmt in beiden Fällen den gleichen Wert an.
Der Projektionsbild-Abbildungsmaßstab errechnet sich nach Gl. (8.3), die für die Mikroprojektion in

$$M_{\text{Projektionsbild}} = V_{\text{Mikroskop}}\ 4\ \text{Projektionsentfernung in m} \quad (8.28)$$

umgeformt werden kann.
Für ein gewähltes Beispiel – Betrachtungsentfernung 8 bis 16 m – sind die zur Erreichung des förderlichen Abbildungsmaßstabs notwendigen Okulare in Tafel 8.11 zusammengestellt.

Tafel 8.11. Die erforderliche Okularvergrößerung für eine nach den Grundsätzen eines förderlichen Abbildungsmaßstabs bei 8 bis 16 m Betrachtungsentfernung aufgebaute Mikroprojektionseinrichtung (Projektionsentfernung = 8 m)

Objektiv	1000 A_{Objektiv}	$M_{\text{förderlich}}$ auf Normzahl gerundet	$V_{\text{Mikroskop}}$	V_{Okular}
3,2/0,10	100	3200 : 1	100×	32×
6,3/0,16	160	5000 : 1	160×	25×
16/0,32	320	10000 : 1	320×	20×
40/0,65	650	20000 : 1	650×	16×

Auf diese Weise werden zwar die Verhältnisse der visuellen Mikroskopie auf die Mikroprojektion übertragen, eine nennenswerte Bildhelligkeit kann aber nicht erreicht werden. Das ist in erster Linie durch die Okular-vergrößerung und die auf visuelle mikroskopische Beobachtung ausgelegten Feldzahlen der Okulare bedingt. Beide ergeben vor allem bei größeren Projektionsentfernungen – und gerade diese sind beim Einsatz eines Mikroprojektionsgeräts notwendig – ein für die Zwecke der Mikroprojektion zu großes und nicht ausreichend helles Projektionsbild.
Im Bild 8.57 a wird die Abhängigkeit des Projektionsbild-Durchmessers von der Projektionsentfernung für die PK-Okulare des VEB Carl Zeiss JENA gezeigt. Der Projektionsbild-Durchmesser kann in diesem Fall nach

$$\text{Bilddurchmesser} = \frac{\text{Projektionsentfernung}}{\text{Okularbrennweite}} \times \text{Feldzahl des Okulars} \quad (8.29)$$

errechnet werden.

Für das gewählte Beispiel ergeben sich beim Einsatz der nach Tafel 8.11 erforderlichen Okulare Projektionsbild-Durchmesser von 5 bis 6,5 m.

Zwei Auswege führen aus dieser bei der Mikroprojektion unter Beachtung des förderlichen Abbildungsmaßstabs sich ergebenden Situation heraus. Als erstes ist die Projektion eines Kleinbilddiapositivs zu nennen, das unter Bedingungen, die eine Lichtschädigung des Objekts ausschließen, aufgenommen und hinsichtlich seines Abbildungsmaßstabs an die räumlichen Gegebenheiten der Projektion angepaßt werden kann.

Die zweite, von *Köhler* [559] angegebene Möglichkeit besteht in einer Herabsetzung der Okularvergrößerung bei der Projektion und nachfolgender Fernrohrbeobachtung des Projektionsbilds. Wird die Okularvergrößerung um den Faktor 3 × bis 10 × kleiner gewählt, als zur Erreichung des förderlichen Abbildungsmaßstabs notwendig ist, und das so 9 × bis 100 × hellere Bild mit einem 3 × bis 10 × vergrößernden Fernrohr betrachtet, dann erscheint dem Betrachter das wesentlich hellere Projektionsbild genauso groß, als würde es im ursprünglichen Abbildungsmaßstab mit bloßem Auge betrachtet.

Die beiden Verfahren – Projektion eines Kleinbilddiapositivs und Fernrohrbeobachtung des Projektionsbilds – müssen bei der projektionsmikroskopischen Bildwiedergabe dort angewendet werden, wo es um die Ausschöpfung des Auflösungsvermögens des Mikroskops geht.

Mikroprojektion nach den Grundsätzen der Diaprojektion

In der Praxis der Mikroprojektion für eine größere Betrachteranzahl geht man – in erster Linie zur Erzielung eines ausreichend hellen Projektionsbilds bei vertretbarer Strahlungsbelastung des Objekts – von den Festlegungen der Diaprojektion aus und überträgt diese auf die Mikroprojektion. Nach TGL 15468 soll ein Diapositiv so ausgeführt sein, daß aus einem Betrachtungsabstand von 6facher Bildbreite alle Einzelheiten erkannt werden können. Die Größe des Bilds wird danach vom größten Betrachtungsabstand bestimmt – sie soll 1/6 dieses Abstands sein. Man kann nun das Zwischenbild im Mikroskop als Ausgang für eine Diaprojektion, sozusagen als *Mikrodia* ansehen und dieses bei der Projektion auf eine den Festlegungen der Diaprojektion entsprechende Projektionsbildgröße bringen.

Diese Projektionsart hat nennenswerte Vorteile. Zur Mikroprojektion können spezielle Projektive oder Projektionsokulare verwendet werden, die so ausgelegt werden können, daß, unabhängig von der Brennweite des Projektivs, ein konstanter Zwischenbilddurchmesser der Projektion zugrunde gelegt wird. Das Projektiv übernimmt in diesem Fall die Funktion eines Projektionsobjektivs und kann auf diesen Verwendungszweck optimal korrigiert werden. Durch entsprechende Wahl der Projektivbrennweite kann die Aufstellung des Mikroprojektionsgeräts in einfacher Weise an die Verhältnisse des Projektionsraums angepaßt werden. Die Bildhelligkeit ist dann –

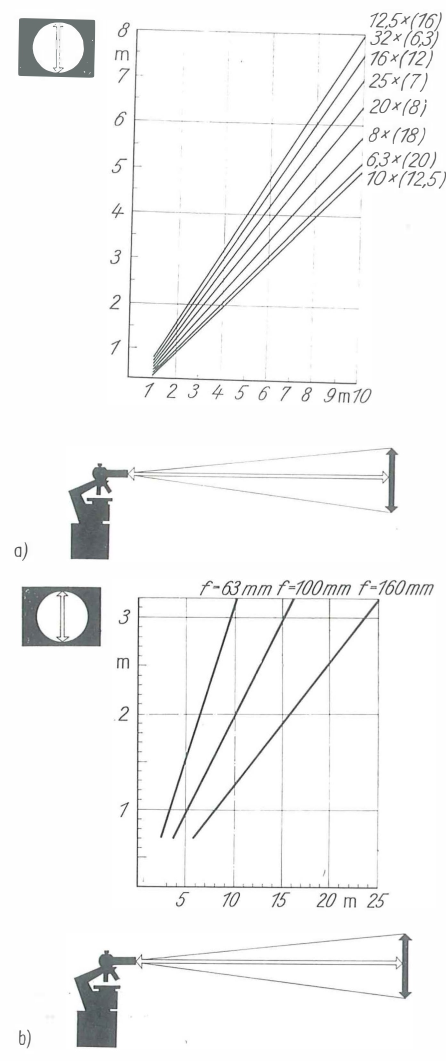


Bild 8.57. Abhängigkeit des Projektionsbild-Durchmessers von der Projektionsentfernung

a) für die PK-Okulare;
b) für die Projektive zur Mikroprojektion (Feldzahl 20) des VEB Carl Zeiss JENA

wenn man die Lichtquelle und die Objektivbestückung des Geräts als gegeben ansieht – vom Aufstellungsort und damit von der Projektionsentfernung unabhängig. Sie wird nun allein vom notwendigen Projektionsbilddurchmesser bestimmt, der seinerseits für den Abbildungsmaßstab des Projektionsbilds maßgebend ist. Durch Verwendung von Projektiven verschiedener Brennweite, aber gleicher Feldzahl, kann die vorgegebene Bildgröße mit verschiedenen Projektiven bei unterschiedlichen Projektionsentfernungen erreicht werden. Durch den Einsatz dieser Projektive werden die größeren Projektionsentfernungen überhaupt erst erreichbar (Bild 8.57 b).
Der Projektionsbild-Abbildungsmaßstab kann nach Gl. (8.25) errechnet werden, die im Fall der Verwendung eines Projektivs in

$$M_{\text{Projektionsbild}} = M_{\text{Objektiv}} \frac{250}{f_{\text{Projektiv}}} \frac{k}{250} \quad (8.30)$$

oder

$$M_{\text{Projektionsbild}} = M_{\text{Objektiv}} \frac{k}{f_{\text{Projektiv}}} \quad (8.31)$$

umgeformt werden kann. In Analogie zur Mikroprojektion mit Okularen gilt auch hier

$$M_{\text{Projektionsbild}} = M_{\text{Objektiv}} F_{\text{Projektion}}. \quad (8.26)$$

Geht man von einer vorgegebenen Projektionsbildgröße aus, dann kann der Projektionsfaktor auch nach

$$F_{\text{Projektion}} = \frac{\text{Projektionsbild-Durchmesser}}{\text{Feldzahl des Projektivs}} \quad (8.32)$$

bestimmt werden. Durch Umformung von Gl. (8.32) ergibt sich der

$$\text{Bilddurchmesser} = \text{Feldzahl des Projektivs } F_{\text{Projektion}}. \quad (8.33)$$

Tafel 8.12. Projektionsfaktor bei der Mikroprojektion mit Projektiven der Feldzahl 20

Projektionsbild-Durchmesser m	0,8	1,0	1,25	1,6	2,0	2,5	3,2	4
$F_{\text{Projektion}}$	40	50	63	80	100	125	160	200

Die Werte des Projektionsfaktors $F_{\text{Projektion}}$ sind für Projektive der Feldzahl 20 in Tafel 8.12 zusammengestellt. Der Vergleich der Abbildungs-

Tafel 8.13. Vergleich der Abbildungsmaßstäbe bei der Mikroprojektion unter Einhaltung des förderlichen Abbildungsmaßstabs und nach den Grundsätzen der Diaprojektion für eine Betrachtungsentfernung von 8 bis 16 m

Objektiv	M_{Bild} bei 2,5m Projektionsbild-Durchmesser	$M_{\text{förderlich}}$ gemäß Tafel 8.11	Faktor der Untervergrößerung
3,2/0,10	400 : 1	3200 : 1	8×
6,3/0,16	800 : 1	5000 : 1	6,3×
16/0,32	2000 : 1	10000 : 1	5×
40/0,65	5000 : 1	20000 : 1	4×

maßstäbe bei beiden Projektionsmethoden wird in Tafel 8.13 gezeigt. Sie enthält in ihrer letzten Spalte noch die Angabe eines *Untervergrößerungsfaktors*, der aussagt, um wievielmal der bei Anwendung der für die Mikroprojektion modifizierten Diaprojektion erzielte Abbildungsmaßstab den von der Objektivapertur und dem Betrachtungsabstand bestimmten förderlichen Abbildungsmaßstab unterschreitet.
Wenn man die Mikroprojektion nach den Grundsätzen der Diaprojektion ausführt, muß man sich darüber im klaren sein, daß die erzielte Bildhelligkeit mit einer erheblichen Unterschreitung des förderlichen Abbildungsmaßstabs erkauft worden ist. Das Projektionsbild läßt infolgedessen nicht alle Einzelheiten erkennen, die das Mikroskop aufgrund der Apertur des benutzten Mikroskopobjektivs aufzulösen in der Lage ist. Meist wird man sich aber trotzdem für das hellere, wenn auch der Regel des förderlichen Abbildungsmaßstabs nicht genügende, nach den Grundsätzen der Diaprojektion bestimmte Projektionsbild entscheiden müssen.

8.7. Zeichnen eines mikroskopischen Bilds

Trotz der wesentlich weniger zeitaufwendigen fotografischen Bildwiedergabe hat das Zeichnen des mikroskopischen Objekts vor allem in der Ausbildung und zu Lehrzwecken noch seine Bedeutung. Der Lernende wird durch das Zeichnen zur intensiven Erfassung des mikroskopischen Bilds und damit zum sachgerechten Mikroskopieren erzogen; der Lehrende vermag durch eine vereinfachte, auf das Wesentliche beschränkte Darstellung das Objekttypische besser zu veranschaulichen.

8.7.1. Zeichenverfahren

Man kann im einfachsten Fall das Bild des mikroskopischen Objekts auf eine Zeichenfläche projizieren und nachzeichnen. Das Projektionszeichnen erfordert eine starke Lichtquelle und einen verdunkelten Arbeitsraum. Das Verfahren ist auf schwache bis mittlere Abbildungsmaßstäbe beschränkt.
Diese Einschränkungen gelten nicht, wenn mit einem Zeichenapparat gearbeitet wird, dessen wesentliches Bauelement ein in der Austrittspupille des Okulars oder deren Nähe angeordneter Strahlenteiler ist. Beim Einblick in das Okular sieht man dann Objekt und Zeichenfläche gleichzeitig. Das Verfahren wird auch als Zeichnen mit dem virtuellen Bild bezeichnet. Es vermittelt den Eindruck, unmittelbar im Objekt zu zeichnen. Durch geeignete Lichtschwächungsvorrichtungen können die Helligkeiten der beiden Bildteile – Bild des mikroskopischen Objekts und Bild der Zeichenfläche – aufeinander abgestimmt werden. Meist werden dazu Lichtregler auf der Basis von Polarisationsfiltern benutzt.

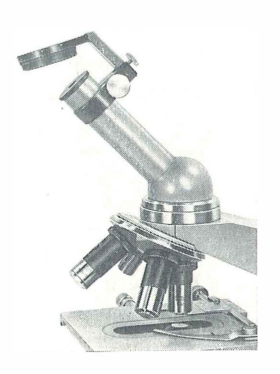


Bild 8.58 Projektionszeichenspiegel
Zeichenspiegel am Mikroskop LABOVAL
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

8.7.2. Geräte zur zeichnerischen Bildwiedergabe

8.7.2.1. Projektionszeichenspiegel

Das Projektionszeichnen erfordert ein reelles Bild des Objekts auf der Zeichenfläche. Das wird durch einen auf den Mikroskoptubus aufklemmbaren Spiegel erreicht (Bild 8.58). Dieser kann entsprechend der Baulänge des Okulars verstellt und je nach Bauhöhe des Mikroskops mehr oder weniger stark geneigt werden.
Von Einschränkungen hinsichtlich der Raum- und der Bildhelligkeit abgesehen, muß beim Arbeiten

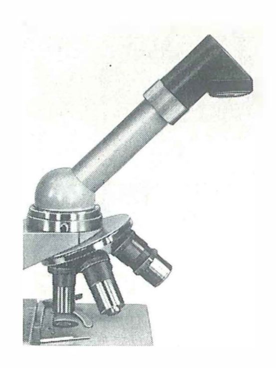


Bild 8.59. Zeichenokular
Zeichenokular A 8 ×
am Mikroskop EDUVAL 2
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

mit einem Projektionszeichenspiegel darauf geachtet werden, daß das Bild nicht durch Schrägprojektion verzerrt wird.

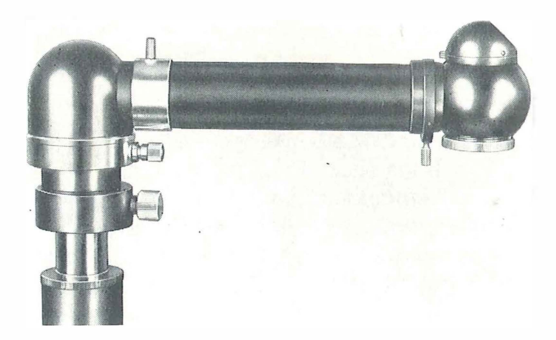
8.7.2.2. Zeichenokular

Das Zeichenokular (Bild 8.59) stellt die einfachste Bauform eines Zeichenapparats dar. Durch die feste Verbindung von Okular, Strahlenteiler und Bildversetzungslinse ist das Zeichenokular auf eine vorgegebene Tubusneigung – z.B. 45° – und auf einen festen Abstand der Zeichenfläche vom Okular ausgelegt. Die letztgenannte Größe kann durch Vorsatzlinsen geändert werden, eine andere Tubusneigung erfordert dagegen einen veränderten Grundaufbau.

8.7.2.3. Zeichenapparat

Zeichenapparate ermöglichen im allgemeinen die Durchführung beider Zeichenverfahren, wenngleich sie – ihrem eigentlichen Verwendungszweck entsprechend – überwiegend zum Zeichnen mit dem virtuellen Bild benutzt werden. Durch Drehung des Strahlenteilers kann auch ein reelles

Bild 8.60. Zeichenapparat als Tubusaufsatz
Zeicheneinrichtung für Mikroskope
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto



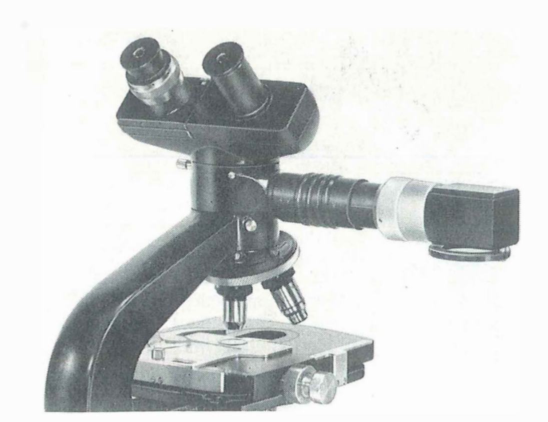


Bild 8.61. Zeichenapparat als Zwischentubus
Wild-Zeichentubus am Mikroskop M 20
Firma Wild, Heerbrugg, Werkfoto

Bild des Objekts auf die Zeichenfläche projiziert werden.
Zeichenapparate werden in zwei Bauformen hergestellt. Als Tubusaufsatz (Bild 8.60) ist der Zeichenapparat an den verschiedensten Mikroskopen verwendbar und an unterschiedliche Einblickrichtungen anpassungsfähig. Er ermöglicht dabei aber nur ein monokulares Arbeiten. Die zweite Bauform benutzt die Einspiegelung eines verkleinerten Bilds der Zeichenfläche in das Zwischenbild des Mikroskops. Mit einem als Zwischentubus ausgebildeten Zeichenapparat (Bild 8.61) kann die zeichnerische Bildwiedergabe auch unter binokularer Beobachtung des Objekts erfolgen.

8.7.3. Sonderverfahren

Schließlich sei noch auf die Möglichkeit der Umzeichnung einer mikrofotografischen Aufnahme hingewiesen, die dann in gewissem Sinne auch eine zeichnerische Wiedergabe des mikroskopischen Objekts darstellt. In diesem Fall wird der Zeichnung das reelle Bild des Objekts nicht in Form eines Projektionsbilds, sondern als Mikrofotogramm zugrunde gelegt. In diesem können die wesentlichen Bildteile als Tuschzeichnung dargestellt und danach das fotografische Bild durch ein Abschwächungsverfahren entfernt oder unterdrückt werden.
Eine weitere Sonderform der Zeichnung liegt in der stereoskopischen Zeichnung vor, die entsteht, wenn man mit einem Zeichenapparat in Verbindung mit einem Stereomikroskop die beiden Halbbilder eines Stereobilds mit Anaglyphenstiften zeichnet und die Zeichnung dann mit einer Anaglyphenbrille betrachtet.

9. Messen und Zählen mit dem Mikroskop

von Dipl.-Phys. *Bernhard Gröbler*

9.1. Einleitung

Die vom Mikroskop erzeugte vergrößerte Abbildung des Objekts ist ähnlich, wenn man von einer geringfügigen Verzeichnung absieht. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, nicht nur die Gestalt des Objekts wahrzunehmen und zu beschreiben, sondern seine Abmessungen quantitativ zu bestimmen. Hierzu mißt man etwa die gesuchte Länge im vergrößerten Bild und dividiert die erhaltene Größe durch den Abbildungsmaßstab. Die meisten mikroskopischen Längen- und Flächenmessungen beruhen auf diesem Grundgedanken. Die so ermöglichte quantitative Untersuchung von geometrischen Objektstrukturen hat große und zunehmende Bedeutung für zahlreiche Zweige von Wissenschaft und Technologie. Bekanntlich hängen die makroskopischen Materialeigenschaften vieler Stoffe von deren mikroskopischem Aufbau aus verschiedenen Körnern, Fasern, Schichten usw. ab. Zur zahlenmäßigen Kennzeichnung dieses Aufbaus sind mikroskopische Verfahren vorzüglich geeignet.

Der Abschnitt gibt einen Überblick über die wichtigsten Meßverfahren, die mit gewöhnlichen Mikroskopen und deren Zusatzgeräten durchgeführt werden können. Dabei bleiben die speziellen technischen Meßmikroskope außer Betracht. Bei jenen dient das Mikroskop meist nur zur Erhöhung der Ablesegenauigkeit (z. B. Komparatoren, Kathetometer), und die eigentliche Messung, d. h. der Vergleich von gesuchter Länge und Maßstab, findet im Objektraum statt. Solche Messungen wollen wir als mikroskopische Messungen 1. Art bezeichnen. Dieser Abschnitt beschäftigt sich überwiegend mit mikroskopischen Messungen 2. Art, bei denen der Vergleich von gesuchter Länge und Maßstab im Bildraum stattfindet. Bei mikroskopischen Messungen 2. Art muß im Gegensatz zu denen 1. Art eine verzeichnungsarme Abbildung vorausgesetzt werden. Ferner wird bei Messungen 2. Art die Tiefenausdehnung der Objekte nicht erfaßt (vgl. Abschn. 6.1.4.4.).

9.2. Grundlagen des mikroskopischen Messens [573] [575]

9.2.1. Längenmessung mit dem Mikroskop

9.2.1.1. Messung mit Okularskale – Bestimmung des Skalenwerts

Die mikroskopische Messung des Abstands zweier Objektpunkte (z. B. eines Korndurchmessers oder der Länge einer Wollfaser) geschieht nach folgendem, sich bei allen Aufgaben der Mikrometrie ähnlich wiederholendem Muster. Man benötigt ein gewöhnliches Mikroskop mit stellbarem Okular und eine Okularmeßplatte. Die Okularmeßplatte (Bild 9.1) trägt einen geeigneten Maßstab. Sie wird an den Ort des reellen Zwischenbilds des Mikroskops gebracht. Dazu dienen spezielle, stellbare Okulare, bei denen die Feldblende ausgeschraubt werden kann und eine Aufnahme für standardisierte Okularmeßplatten hat.

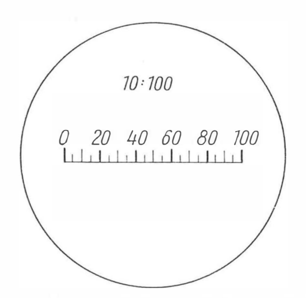


Bild 9.1. Okularmeßplatte 10: 100

In diese Aufnahme legt man die Meßplatte so ein, daß die die Teilung tragende Seite auf der Feldblende liegt. Die verstellbare Augenlinse dient zur Scharfeinstellung der Skale. Dazu dreht man zunächst die Augenlinse so weit heraus, bis die Skale unscharf erscheint. Sodann dreht man sie bei entspanntem Auge so weit zurück, bis die

Skale gerade scharf wird. Dadurch wird garantiert, daß die Messung und Beobachtung stets mit entspanntem Auge erfolgen. Später soll die Augenlinse nicht mehr verstellt werden. Das derart vorbereitete Meßokular wird in den Mikroskoptubus eingesetzt.

Zur weiteren Vorbereitung der Messung muß noch der Skalenwert der Okularskale bestimmt werden, d.h. die Länge im Objektraum (in mm oder μm), die einem Skalenteil der Okularmeßplatte (ohne Rücksicht auf deren Bezifferung) entspricht. Es gilt

Skalenwert = Teilstrichabstand der Okularskale/ Abbildungsmaßstab.

Sind der Teilstrichabstand der Okularskale sowie der Abbildungsmaßstab in der Zwischenbildebene bekannt, so kann daraus der Skalenwert errechnet werden.

Für die Okularmeßplatte (Bild 9.1) beträgt der Teilstrichabstand 0,1 mm. Bei einem Abbildungsmaßstab von 40 : 1 ist der Skalenwert also gleich 0,0025 mm. Der Abbildungsmaßstab hängt vom verwendeten Objektiv, von der Tubuslänge, evtl. vom Vergrößerungsfaktor einer Zwischenabbildung und vom Okular ab (sofern es sich nicht um ein Vorderblendenokular handelt). Für überschlägliche Messungen bis zu einer erforderlichen Genauigkeit von etwa $\pm$ 12% reicht es zur Bestimmung des Gesamtabbildungsmaßstabs aus, wenn man die auf den verschiedenen an der Abbildung beteiligten optischen Systemen aufgravierten Faktoren miteinander multipliziert.

Für genauere Messungen empfiehlt es sich, den Skalenwert empirisch mit einer Objektmeßplatte zu bestimmen. Im Bild 9.2 wird eine übliche Objektmeßplatte gezeigt. Sie trägt in der Mitte eine 1 mm lange Strichskale mit 100 gleichen Teilen (d.h., Teilstrichabstand = 10 μm), die mit einem kreisförmigen Deckglas standardisierter Dicke

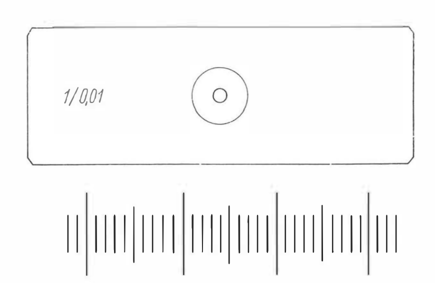


Bild 9.2. Objektmeßplatte 1/0,01
oben: natürliche Größe;
unten: vergrößerter Ausschnitt der Strichskale

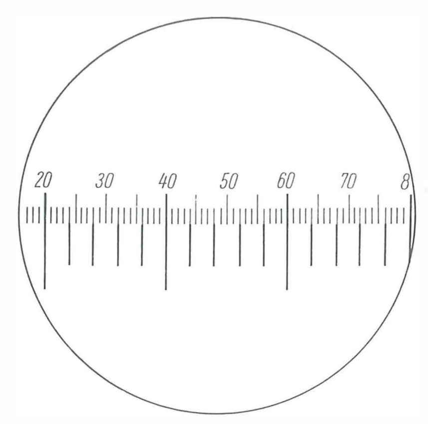


Bild 9.3. Bestimmung des Skalenwerts

abgedeckt ist. (Das Deckglas entfällt bei Objektmeßplatten für Auflicht.) Die Skale ist zum leichteren Finden mit einem breiten Ring umgeben. Die Abweichungen der Lage der Teilstriche eines solchen Objektmaßstabs vom Sollwert bleiben bei den Erzeugnissen namhafter Hersteller an jeder Stelle der Skale unter $\pm$ 1μm.

Praktisch geschieht die Bestimmung des Skalenwerts der Okularskale mit einer Objektmeßplatte folgendermaßen. Man legt die Objektmeßplatte unter das Mikroskop, stellt scharf und richtet es so ein, daß das vergrößerte Bild der Objektskale parallel zur Okularskale liegt und bequem mit dieser verglichen werden kann (Bild 9.3). Entsprechen dann n Skalenteile der Okularmeßplatte n' Skalenteilen der Objektmeßplatte, so ergibt sich der Skalenwert der betreffenden Meßeinrichtung zu

$$S = \frac{n'}{n} \text{ Teilstrichabstand der Objektmeßplatte.}$$

(Im Bild 9.3 ist $n'/n = 0{,}25$, also $S = 0{,}0025$ mm). Es empfiehlt sich, zur Skalenwertbestimmung eine möglichst große Anzahl von Skalenteilen heranzuziehen. Dadurch wird eine höhere Genauigkeit gewährleistet. Im günstigsten Fall, wenn an den Enden der zu vergleichenden Strekken die Teilstriche koinzidieren, sind n und n' ganze Zahlen. Dies läßt sich nicht immer erreichen. Man wählt dann vorzugsweise n' ganz und schätzt die Bruchteile von n.

Bedeutend erleichtert wird die Skalenwertbestimmung bei Verwendung eines pankratischen Tubus. Damit ist es möglich, durch kontinuierliche Variation des Abbildungsmaßstabs sowohl n als auch n' als ganze, möglichst ohne Rest teilbare Zahlen zu wählen, so daß der Zahlenwert für S besonders

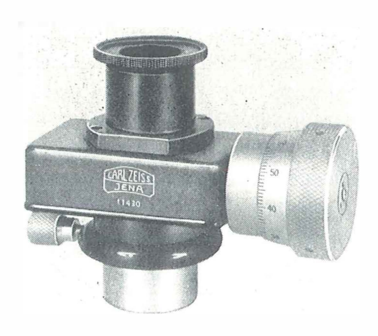


Bild 9.4. Meßschraubenokular

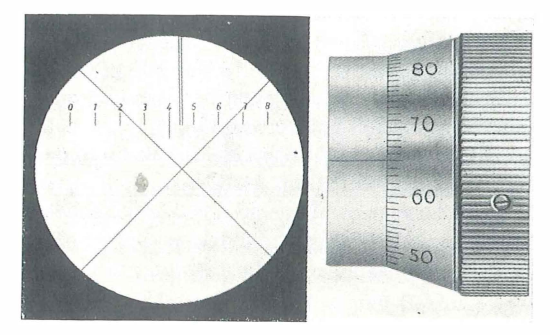


Bild 9.5
a) Dingfeld des Meßschraubenokulars;
b) entsprechende Stellung der Meßtrommel

bequem wird. Eine ähnliche, oft empfohlene Methode zur Anpassung von n und n' besteht darin, einen Ausziehtubus zu benutzen und dessen Länge geeignet zu wählen. Dies hat jedoch den Nachteil, daß sich der Korrektionszustand der Abbildung mehr oder weniger verschlechtert, weshalb dieses Verfahren nur bei geringen Ansprüchen angewendet wird.

Nach der Skalenwertbestimmung kann die Messung beginnen. Man fokussiert das zu messende Objekt mit Hilfe des Feintriebs so, daß es gleichzeitig mit der Okularskale scharf gesehen wird. Durch Verschieben und Drehen des Objekts bringt man die Skale mit der zu messenden Strecke im Bild zur Deckung und führt die Messung durch.

Höhere Meßgenauigkeiten lassen sich mit dem Meßschraubenokular erzielen (Bild 9.4). Dieses wird ebenso wie andere Okulare in den Tubus eingesetzt und durch eine Schraube festgeklemmt. Im Bild 9.5 ist das Dingfeld des Meßschraubenokulars dargestellt. Außer einer bezifferten Strichskale mit dem Teilstrichabstand 1 mm befindet sich darin ein Fadenkreuz, das mit Hilfe der Meßschraube quer über das Dingfeld bewegt werden kann und das als Meßmarke dient. Die Trommel der Meßschraube gestattet den Bruchteil des Strichabstands der Okularskale abzulesen, bei dem sich die Fadenkreuzmitte gerade befindet. Dadurch erhöht sich die Ablesegenauigkeit gegenüber der einfachen Okularskalenmessung um den Faktor 10 (die Trommelteilung unterteilt den Teilstrichabstand der Okularskale in 100 Teile). Die Bestimmung des Skalenwerts der Meßschraube erfolgt sinngemäß wie bei der einfachen Okularmeßplatte.

Hinweis: Die Reihenfolge der Einstellungen bzw. Ablesungen richtet man möglichst so ein, daß die Schraube stets gegen den Federdruck bewegt wird (Rechtsdrehung). Dadurch wird der Einfluß der mechanischen Lose weitgehend unterdrückt. Dies gilt grundsätzlich für alle derartigen Meßhilfsmittel mit Rückstellfeder. Ferner muß bei Messungen mit dem Meßschraubenokular darauf geachtet werden, daß bei der Betätigung der Meßtrommel das Okular nicht relativ zum Objekt verschoben wird (durch leichtes Verbiegen des Tubus usw.).

Besonders gute Ergebnisse erzielt man mit Meßokularen, die nach der Bildaufspaltungsmethode arbeiten [586]. Dieses Meßverfahren kann u.a. mit dem INTERPHAKO-Mikroskop nach *Beyer* und *Schöppe* durchgeführt werden (s. Abschn. 6.1.3.). Dabei werden durch eine geeignete Anordnung von Strahlenteilern, Spiegeln usw. von jedem Objekt zwei gleiche Bilder im Dingfeld erzeugt. Durch eine von außen zu betätigende Meßschraube ist die gegenseitige Lage der optischen Elemente so veränderbar, daß der Abstand der beiden Bilder des Objekts von Null bis zu einem gewissen Maximalwert kontinuierlich eingestellt werden kann (Bild 9.6). Berühren sich beide Bilder gerade an ihren einander gegenüberliegenden Rändern, so entspricht ihr Abstand dem Durchmesser D des Objekts an der Berührungsstelle. Der eingestellte Abstand kann z.B. an einer Trommelteilung abgelesen werden. Da bei diesem Verfahren keine Skalenstriche oder ähnliche Meß-

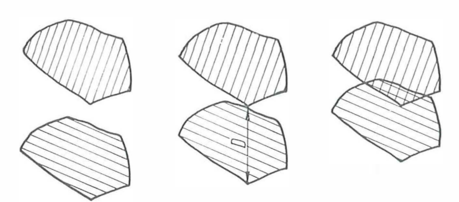


Bild 9.6. Doppelbilder eines Objekts, wie sie bei der Dysonschen Bildaufspaltungsmethode erzeugt werden.
Es sind drei verschiedene Aufspaltungsbeträge dargestellt. Das mittlere Bild erfüllt das Einstellkriterium

marken benutzt werden, die einen anderen Kontrast als das Bild des Objekts haben, ist, wie *Dyson* gezeigt hat, eine viel höhere Einstellgenauigkeit gegeben als bei den üblichen Okularmeßmethoden. Die Einstellunsicherheit beträgt in günstigen Fällen 1/10 des Auflösungsvermögens des verwendeten Mikroskops.

9.2.1.2. Messung am projizierten mikroskopischen Bild und am mikrofotografischen Bild

Wesentlich bequemer gestalten sich mikroskopische Messungen, wenn man sie an einem körperlich zugänglichen Bild vornehmen kann. Diese bequem zugänglichen Bilder erhält man z. B. mit dem Zeichenspiegel. Das stark vergrößerte Bild wird dabei auf einer geeigneten Projektionsfläche aufgefangen. Es kann dann mit einem normalen Lineal, einem Meßschieber o. ä. gemessen werden. Das hat den Vorteil, daß man die Skale oder die Meßmarke leicht in jede gewünschte Lage zum Bild bringen kann. Ferner besteht die Möglichkeit, beliebige, der speziellen Meßaufgabe besonders angepaßte Skalen, Netze oder Vergleichsbilder zu verwenden, die der Anwender selbst herstellen kann. Die Bestimmung des Skalenwerts erfolgt mit Hilfe einer Objektmeßplatte nach den gleichen Grundsätzen, wie sie im Abschnitt 9.2.1.1.beschrieben wurden. Eine weitere Erhöhung der Bequemlichkeit ergibt sich bei Verwendung eines Demonstrationsansatzes bzw. Projektionsschirms.
Solche Projektionseinrichtungen zeichnen sich durch besonders große Lichtstärke aus. Auch hier ist das stark vergrößerte Bild bequem zugänglich. Ebenfalls ist es möglich, handelsübliche oder selbst hergestellte Maßstäbe (auf Klarsichtfolie) zu verwenden.
Ähnliche Vorteile bietet es, wenn man vom zu messenden Objekt eine Mikrofotografie herstellt und daran die Messung durchführt. Allerdings entfällt dann die bei den vorher besprochenen Verfahren bestehende Möglichkeit, auf in verschiedenen Tiefen liegende Ebenen des Objekts scharf einzustellen.
Dies ist besonders bei Streupräparaten mit breiter Größenverteilung der Körner ein Nachteil. Denn es kann mit dem Mikroskop stets nur ein kleiner, von der numerischen Apertur und dem Gesamtabbildungsmaßstab abhängiger Tiefenbereich gleichzeitig scharf abgebildet werden (s. Schärfentiefe, Abschn. 2.). Enthält ein Streupräparat z. B. Körner vom Dmr. 1 bis 50 µm, so lassen sich die Umrisse der kleinsten Körner wegen der erforderlichen hohen numerischen Apertur nicht mehr gleichzeitig mit denen der größten Körner scharf abbilden. Aus diesen Gründen ist die Mikrofotografie nur dann ein geeignetes Hilfsmittel zur mikroskopischen Messung, wenn die interessierenden Objektdetails innerhalb der Schärfentiefe liegen.

9.2.1.3. Genauigkeit mikroskopischer Messungen

Da das Mikroskop wie alle optischen Instrumente ein endliches Auflösungsvermögen hat, erfolgt die Abbildung nicht mit mathematischer Schärfe (s. Abschn. 3.). Bei mikroskopischen Messungen bewirkt dieser Umstand eine Einstellunsicherheit bzw. Ableseunsicherheit. Diese liegt in der Größenordnung der optischen Auflösungsgrenze. Das bedeutet, daß bei Verwendung stärkster Objektive und unter im übrigen idealen Bedingungen mit dem Lichtmikroskop Meßgenauigkeiten von 0,1 bis 0,2 µm erreichbar sind. Die kleinsten lichtmikroskopisch sinnvoll meßbaren Strukturelemente haben daher eine Ausdehnung von etwa 1 µm.
Mit der Bildaufspaltungsmethode nach *Dyson* sind ausnahmsweise Teilchen vom Dmr. 0,2 µm noch mit ausreichender Reproduzierbarkeit meßbar.
Die durch das endliche Auflösungsvermögen bedingte Einstell- bzw. Ableseunsicherheit hat einen im wesentlichenstatistischen Meßfehler zur Folge.
Der statistische Fehler des Meßergebnisses setzt sich zusammen aus dem bei der Skalenwertbestimmung und dem bei der Messung entstehenden Fehler. Die Standardabweichung des Meßergebnisses ist daher nach der Gleichung $\sigma_{\text{erg}} = \sqrt{\sigma_S^2 + \sigma_{\text{Mess}}^2}$ zu bilden, wobei σ_S die Standardabweichung der Skalenwertbestimmung und σ_{Mess} die Standardabweichung der Messung ist. Die regelrechte Berechnung von Skalenwert und Meßwert sowie der zugehörigen Standardabweichungen als Mittelwerte aus einer Meßreihe empfiehlt sich dann, wenn die Ablesegenauigkeit größer ist als die Einstellgenauigkeit (z. B. beim Meßschraubenokular). Bei dem üblichen Verhältnis von numerischer Apertur und Abbildungsmaßstab der Objektive wird mit der Ablesegenauigkeit der gewöhnlichen Okularmeßplatten die durch die Auflösungsgrenze gegebene Einstellgenauigkeit etwa gerade ausgeschöpft. Bei Objekten geringer Dicke empfiehlt es sich, mikroskopische Messungen auch bei schwacher erforderlicher Vergrößerung mit Objektiven möglichst hoher nume-

rischer Apertur durchzuführen, weil hierdurch die Konturenschärfe des Bilds und damit die Meßgenauigkeit gesteigert werden. Schließlich sei noch bemerkt, daß die Einstellgenauigkeit bei Messungen im mikroskopischen Bild nicht allein von der Abbildungsschärfe abhängt, sondern in starkem Maße auch von der geometrischen Gestalt des Objekts und der Meßmarke. Eine strichförmige Meßmarke läßt sich z. B. bei Verwendung des gleichen optischen Systems mit viel größerer Sicherheit auf die Mitte eines Doppelstrichs als auf den Rand einer Kreisfläche einstellen. Außer statistischen Meßfehlern sind bei mikroskopischen Messungen systematische Fehler zu berücksichtigen. An erster Stelle der Ursachen steht wieder die Beugung. Die durch sie hervorgerufene Kantenunschärfe bewirkt eine geringe Verlagerung des Bilds der Kante, und zwar meist im Sinne einer scheinbaren Vergrößerung des Objekts. Sie beträgt etwa die Hälfte des Radius des Beugungsscheibchens (Gl. 2.54b). Dabei spielen Eigenschaften des menschlichen Auge sebenfalls eine wichtige Rolle (Macheffekt [650]). Die beugungsbedingten systematischen Fehler wirken sich bei sehr kleinen Objekten am schwerwiegendsten aus. Gründliche Untersuchungen zu diesen Fragen sind enthalten in [576] [649] [647] [650].

In diesem Zusammenhang muß ferner die Verzeichnung des optischen Systems genannt werden. Die Verzeichnung von Mikroskopobjektiven ist im allgemeinen vernachlässigbar gering. Wenn in Projektion gemessen wird, muß die Verzeichnung des benutzten Okulars bzw. Projektionssystems in Rechnung gestellt werden. Der resultierende Betrag der Verzeichnung liegt meist zwischen 2 und 4%. Mit dieser Zahlenangabe ist gemeint, daß eine kleine, radial gerichtete Objektstrecke am Rande des Dingfelds um 2 bis 4% gegenüber der in der Feldmitte gemessenen Länge verkürzt oder verlängert erscheint. In der Feldmitte verschwindet der Verzeichnungsfehler. Einen wesentlichen Einfluß auf die Abbildungstreue und damit auf die Meßgenauigkeit hat die Beleuchtung. Besonders bei ausgesprochen 3-dimensionalen Objekten, wie Kugeln, zylindrischen Fasern und Mineralkörnern, weicht die im Bild gemessene scheinbare Größe von der wahren Größe etwas ab. Diese Tatsache ist auf bestimmte Beugungs-, Reflexions- und Brechungsvorgänge in bzw. an den Objekten zurückzuführen. Betrag und Richtung dieses systematischen Fehlers hängen von der Geometrie des Objekts, vom verwendeten Beleuchtungs- bzw. Kontrastverfahren, von der Beleuchtungsapertur, vom Einbettungsmittel sowie von der Fokussierung ab. Besonders ungünstige Verhältnisse herrschen in dieser Hinsicht beim Dunkelfeldverfahren und bei schiefer Beleuchtung. Die zuverlässigsten Ergebnisse liefern die Hellfeldverfahren, sowohl im Durchlicht als auch im Auflicht. Der Betrag und die praktische Bedeutung der genannten Fehler sind, je nach den Umständen, sehr verschieden zu veranschlagen. *Loquin* [616] schätzt für den Fall kugeliger Objekte $\leqq 10\ \mu m$ den systematischen Fehler auf etwa 25%. Eine allgemeingültige Regel zur Berücksichtigung oder Beseitigung der Fehler läßt sich nicht angeben. Man sollte sich jedoch in jedem konkreten Fall über diese Einflüsse Rechenschaft ablegen. Bei ebenen Objekten, wie sie etwa in elektronischen Mikroschaltkreisen vorliegen, treten die erwähnten Fehler nicht auf. Eine weitere Fehlerquelle ist ggf. eine Bildfeldwölbung, sofern die Meßobjekte einen größeren Teil des Dingfelds einnehmen. Bei den modernen Planobjektiven kann dieser Effekt jedoch außer Betracht bleiben.

Zum Schluß sei noch auf einige Probleme der Meßgenauigkeit bei der Ausmessung von Mikrofotogrammen hingewiesen. Zunächst muß sichergestellt sein, daß die Deformationen des Fotomaterials beim Trocknen das zulässige Maß nicht überschreiten. Oft wird der Fotoprozeß benutzt, um den Kontrast der Meßobjekte und damit ihre Randschärfe zu erhöhen. Dadurch kommt es jedoch zu einer Verlagerung des Rands, meist in Richtung des dunkleren Gebiets. Damit wird aber die beabsichtigte Erhöhung der Meßgenauigkeit illusorisch.

9.2.2.
Winkelmessung mit dem Mikroskop

Bei der Untersuchung verschiedener mikroskopischer Objekte, namentlich von Kristallen, ist die Bestimmung von Winkeln wichtig. Bevor ein Winkel mit dem Mikroskop gemessen werden kann, muß geprüft werden, ob seine beiden Schenkel in einer zur optischen Achse des Mikroskops senkrechten Ebene liegen. (Beide Schenkel müssen gleichzeitig scharf gesehen werden.) Meist wird die mikroskopische Winkelmessung als Messung 1. Art durchgeführt, nämlich mit Hilfe eines zentrierten Drehtisches, der mit einer Gradeinteilung versehen ist (s. Abschn. 6.1.4.). Zum Bestimmen von Winkeln aus mikroskopischen Messungen 2. Art dienen die sog. Goniometerokulare, bei denen sich in der Zwischenbildebene ein drehbares Strichkreuz befindet. Die jeweilige Stellung des Strichkreuzes kann an einer Gradeinteilung

abgelesen werden. Die Messung des Winkels erfolgt analog wie beim Drehtisch.
Eine weitere Möglichkeit zum Bestimmen von Winkeln an mikroskopischen Objekten besteht in dem Umweg über drei Längenmessungen. Hierzu ermittelt man nach einem der im Abschn. 9.2.1. besprochenen Verfahren die drei Seiten eines Dreiecks, von denen zwei den gesuchten Winkel einschließen, und berechnet diesen nach dem Kosinussatz.

9.2.3. Flächenmessung mit dem Mikroskop

Die Ermittlung des Inhalts mikroskopischer Flächen ist eine häufig zu lösende Aufgabe der Mikrometrie. Ein einfacher Lösungsweg besteht in der Verwendung einer Okularnetzplatte. Bei der im Bild 9.7 gezeigten üblichen Ausführung

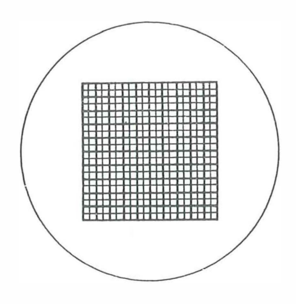


Bild 9.7 Okularnetzplatte 400/0,5 × 0,5

handelt es sich um ein quadratisches Meßfeld (10 mm × 10 mm), das in 400 Quadrate der Seitenlänge 0,5 mm unterteilt ist. Die Okularnetzplatte wird in ein stellbares Okular eingelegt (s. Abschn. 9.2.1.1.). Man rückt das Meßobjekt so in die Dingfeldmitte, daß es von dem Okularnetz vollständig überdeckt wird. Nun werden alle Quadrate gezählt, die völlig innerhalb der zu messenden Fläche liegen. Dazu addiert man die halbe Anzahl der Quadrate, die von der Berandung der zu messenden Fläche geschnitten werden. Die erhaltene Summe ist der gesuchte Flächeninhalt in Einheiten des Okularnetzes. Um den wirklichen Inhalt der Objektfläche (etwa in μm^2) zu bestimmen, muß das Zählresultat noch mit dem Quadrat des Skalenwerts des Netzokulars multipliziert werden. Unter dem Skalenwert des Okularnetzes versteht man die Länge im Objektraum (etwa in μm), die der Seitenlänge eines Teilquadrats entspricht. Die Ermittlung des Skalenwerts ist im Abschn. 9.2.1.1.erläutert.
Auch bei der mikroskopischen Flächenmessung bedeutet das Arbeiten in Projektion eine wesentliche Erleichterung (s. Abschn. 9.2.1.2.). Als Projektionsfläche kann man Millimeterpapier oder einfach kariertes Papier benutzen. Dadurch wird der Beobachter in die Lage versetzt, die bereits gezählten Quadrate mit einem Merkstrich zu versehen und Fehlzählungen zu vermeiden. Ferner erhält man durch die Projektion die Möglichkeit, das Bild der Objektfläche mit einem handelsüblichen Planimeter zu planimetrieren.
Ein häufig erwähntes Vorgehen zur Flächenmessung besteht darin, die zu messende Fläche aus Karton oder Metallfolie auszuschneiden und anschließend zu wägen.
Alle diese Verfahren sind auch auf Mikrofotogramme anwendbar.
Falls es sich um nicht zu kompliziert gestaltete Meßobjekte handelt, und wenn im übrigen die Aufgabe besteht, eine größere Anzahl von verschieden großen Flächen zu bestimmen und ihre Flächengrößenverteilung festzustellen, genügt es oft, die Flächen nach einer Reihe von Vergleichsflächen einzustufen. Als Vergleichsfigur wird meist der Kreis verwendet. Im Bild 9.8 wird ein typisches Beispiel einer derartigen Kugel- und Kreisreihe gezeigt. Es werden überwiegend solche Reihen angewendet, bei denen sich die Flächeninhalte benachbarter Kreise um den Faktor 2 unterscheiden. Mitunter sind auch feinere bzw. gröbere Stufungen zweckmäßig.

Genauigkeit mikroskopischer Flächenmessungen

Abgesehen von den stets zu beachtenden Fehlermöglichkeiten durch die optische Abbildung (s. Abschn. 9.2.1.3.), sind bei den verschiedenen Flächenmeßverfahren noch Verfälschungen des Meßergebnisses zu erwarten, die ihre Ursache in der Methode haben. Bei der Auszählung von Quadratnetzen hängt die statistische Genauigkeit

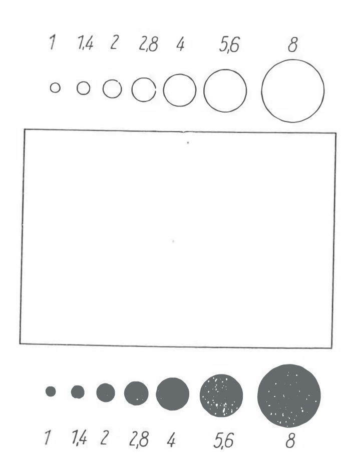


Bild 9.8 Okularmeßplatte – Kugel und Kreis – (globe and circle graticule)

in erster Linie von der Größe der Quadrate ab, die die Zähleinheit bilden. Der Fehler ist um so geringer, je kleiner diese Quadrate sind. Weiterhin ist der Fehler um so größer, je länger der Rand des Meßobjekts ist. Setzt man voraus, daß sich die Fehler, die an den einzelnen vom Rand getroffenen Quadraten entstehen, quadratisch addieren, so kann man die zu erwartende Standardabweichung nach folgender Gleichung abschätzen:

$$\sigma \approx 0{,}3\,\sqrt{La^3}\,; \tag{9.1}$$

L Länge des Objektrands,
a Seitenlänge der Zählquadrate.

Das bedeutet: Eine etwa kreisförmige Fläche von $100a^2$ Flächeninhalt kann auf rund $2a^2$ ($\triangleq 2\%$) genau bestimmt werden. Über die Genauigkeit der Planimetermessungen gehen die Ansichten der verschiedenen Autoren z. T. weit auseinander. Sie hängt offensichtlich stark von den speziellen Bedingungen der Messung ab, u. a. von der Oberflächenbeschaffenheit der Unterlage. Mehrmaliges Umfahren der Meßfläche erhöht die Genauigkeit.

Die Kugel- und Kreismethode hat bezüglich der Einzelmessung eine geringe Genauigkeit. Besonders bei stark von der Kreisform abweichenden Meßobjekten führt der Vergleich mit derartigen Kreisreihen zu Fehleinschätzungen. Hierfür sind verschiedene physiologisch-optische Effekte verantwortlich. *Watson* und *Mulford* [645] versuchten mit Erfolg, diese Schwierigkeit zu meistern, indem sie regelmäßig ein Training mit Testkarten durchführten, auf denen ein Ensemble von Flächen verschiedener Form und bekannter Größe dargestellt war. Außer von der Korngestalt ist die Genauigkeit der Vergleichsmethode noch vom Kontrast des zu messenden Bilds abhängig. Bei starken Kontrasten sind die Fehler größer. Die Methode ist daher nur für statistische Zwecke geeignet, d. h., wenn es auf die Genauigkeit der Einzelmessung nicht ankommt.

9.2.4. Volumenmessung mit dem Mikroskop

Das Volumen mikroskopischer Objekte kann ermittelt werden, wenn sie eine einfache, bekannte Gestalt haben. Man bestimmt dazu die Abmessungen des Objekts (z. B. Länge, Breite, Höhe) und errechnet daraus nach bekannten Gleichungen das Volumen. Sind die Objekte kugelförmig, lassen sich hohe Genauigkeiten erreichen. Auch bei etwa äquidimensionalen Objekten (z. B. Quarzkörner) ist die Berechnung des äquivalenten Kugelvolumens aus dem Durchmesser für viele Zwecke noch hinreichend genau. Bei irregulären Körnern stellen die aus den Abmessungen berechneten Volumina nur grobe Schätzwerte dar, die aber häufig wertvoll sind.

Besonders in der Biologie besteht oft die Aufgabe, das Volumen von unregelmäßigen Objekten zu bestimmen, deren Abmessungen die Größenordnung Millimeter haben. Hierzu zerschneidet man das betreffende Objekt in eine Folge von Scheiben gleicher bekannter Dicke d, mißt deren Fläche A_i (i Nummer der Scheibe) und bestimmt das Volumen nach der Gleichung

$$V = d \sum A_i\,. \tag{9.2}$$

Über die Messung der Volumina kleiner Grübchen berichtet *Martin* [619].

9.2.5. Mikroskopische Messungen 1. Art

Unter mikroskopischen Messungen 1. Art wollten wir solche verstehen (s. Abschnitt 9.1.), bei denen der Vergleich von Meßobjekt und Meßskale im Objektraum stattfindet und nicht, wie in fast allen bisher besprochenen Fällen, im vergrößerten Bild. Meist wird dazu das Objekt relativ zum Mikroskop um die entsprechende Strecke verschoben. Da bei solchen Messungen nur die Mitte des Dingfelds benutzt wird, stört etwaige Verzeichnung der Optik nicht. Der Abbildungsmaßstab der optischen Anordnung geht nicht in den Meßwert ein (wohl aber in die Meßgenauigkeit).

9.2.5.1. Messungen mit der Skale des Objekttisches

Derartige Messungen sind dann unumgänglich, wenn das Meßobjekt größer ist als das nutzbare Dingfeld (s. Abschn. 9.2.1.3.). Man benötigt ein Okularstrichkreuz und einen Objekttisch, der in zwei zueinander senkrechten Richtungen verschiebbar ist und für jede Richtung eine Skale trägt. Es werden nun erst der eine und dann der andere Endpunkt der zu messenden Strecke l unter den Fadenkreuzmittelpunkt geschoben. Dazu liest man die Koordinaten x_1, y_1 bzw. x_2, y_2 der Endpunkte der betreffenden Strecke ab. Die Strecke l ist dann

$$l = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}\,. \tag{9.3}$$

Steht nur eine Verschiebungsrichtung mit Skale am Tisch zur Verfügung, so muß man die zu

messende Strecke parallel zur Verschiebungsrichtung orientieren.
Bei derartigen Messungen verfährt man stets so, daß sowohl der Anfangs- als auch der Endpunkt der Meßstrecke von der gleichen Verschiebungsrichtung her erreicht werden. So wird der Einfluß der mechanischen Umkehrspanne im Antriebsmechanismus des Tisches ausgeschaltet. Die Objekttische normaler Mikroskope sind nicht für Meßzwecke ausgelegt, so daß Meßgenauigkeit und Ablesegenauigkeit nicht die Werte erreichen, die für Komparatoren u. ä. gelten.

9.2.5.2.
Tiefenmessung mit dem Feintrieb des Mikroskops

Für bestimmte Meßaufgaben (s. Abschn. 9.2.1.2.) stellt die geringe Schärfentiefe des Mikroskops einen Nachteil dar. Andererseits eröffnet aber die geringe Schärfentiefe des Mikroskops die Möglichkeit, Tiefenmessungen am mikroskopischen Objekt durchzuführen, d.h. Strecken zu messen, die parallel zur optischen Achse des Mikroskops gerichtet sind. Hierzu stellt man nacheinander auf die untere und die obere Begrenzung des Meßgegenstands scharf ein und liest die zugehörige Differenz $\Delta z' = z'_2 - z'_1$ der Stellungen des Feintriebs ab. Dabei durchfährt man die Meßstrecke wiederum stets in gleichbleibender Richtung, und zwar so, daß gegen die Gewichtskraft der hierbei bewegten Baueinheit (Tisch oder Tubusträger) gearbeitet wird. Ist das Meßobjekt in ein Medium der Brechzahl n eingebettet (Luft $n = 1$) und befindet sich zwischen dem Präparat und dem Mikroskopobjektiv ein Medium der Brechzahl n' (Immersion), so beträgt die wahre Tiefenausdehnung des Objekts

$$\Delta z = \Delta z' \, n/n' . \qquad (9.4)$$

Man beachte: Brechzahl und Dicke des Deckglases haben keinen Einfluß auf das Meßergebnis.
Schließlich kann man windschiefe Strecken messen, indem man die Ergebnisse von Tiefenmessung Δz und lateraler Messung Δx, Δy bzw. l miteinander kombiniert:

$$l_{\text{windschief}} = \sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2 + \Delta z^2} . \qquad (9.5)$$

Tiefenmessungen im Bereich der Schärfentiefe kann man nach einem Vorschlag von *Pluta* [631] durchführen, wenn man ein Stereomikroskop benutzt oder eine Stereohilfseinrichtung (s. Bild 7.11) an einem normalen binokularen Mikroskop anbringt. Mittels eines festen und eines verstellbaren Strichs in je einem Okular läßt sich eine scheinbar im Objektraum schwebende Marke erzeugen. Durch Verstellung des beweglichen Strichs wandert die Marke auf und ab und wird so mit in verschiedenen Tiefen liegenden Objekten zur Deckung gebracht. Aus der notwendigen Verschiebung des Okularstrichs kann die gesuchte Tiefenausdehnung errechnet werden.
Das letzte Verfahren wurde hier wegen des inhaltlichen Zusammenhangs geschildert, obwohl es in die Meßmethoden 2. Art eingeordnet werden muß.

9.3.
Spezialaufgaben der Mikrometrie

9.3.1.
Teilchenzählung

Häufig muß die Anzahl von Teilchen (Bakterien, Mineralkörner, Bestandteile von Gewürzpulvern u. ä.), die in einer bestimmten Substanzmenge (Volumen oder Masse) enthalten sind oder eine bestimmte Fläche bedecken, bestimmt werden. Hierzu sind verschiedene Verfahren üblich.

9.3.1.1.
Zählkammermethoden

Zählkammern (in Form von Flachkammern) werden besonders bei medizinischen Untersuchungen häufig angewendet. Dabei sind die verschiedensten Kammertypen gebräuchlich (s. Abschn. 6.1.9.).
Zum Bestimmen der fraglichen Teilchenanzahl je bestimmte Menge der Probensubstanz suspendiert man ein bekanntes Quantum (z.B. 1 mg eines Pulvers) in einem bekannten Volumen einer geeigneten Flüssigkeit. Aus dieser Suspension entnimmt man – unter Vermeidung von Sedimentation – ein definiertes Volumen und füllt damit die Zählkammer. Nachdem sich die Teilchen auf dem Kammerboden abgesetzt haben, werden sie gezählt. Anschließend wird das Zählergebnis auf die ursprüngliche Probenmenge umgerechnet.
Bei der Auszählung muß viel Sorgfalt angewendet werden, um Fehlzählungen zu vermeiden. Günstig ist ein zeilenweises Vorgehen entsprechend der Netzeinteilung der Kammer. Empfehlenswert ist auch hier das Arbeiten in Projektion mit der Möglichkeit, die bereits gezählten Teilchen zu markieren. Eine weitere Erleichterung ergibt sich bei Verwendung eines Zählgriffels, der an ein elektrisches Zählwerk angeschlossen ist, dergestalt, daß jeder Markierungsstrich automatisch gezählt wird.
Ohne Zählkammer kann man auskommen, wenn man ein kleines bekanntes Volumen der verdünnten Suspension auf einem Objektträger ausbreitet, ein-

trocknen läßt und dann die Teilchen zählt. Verwandt mit der Zählkammermethode sind die Verfahren mit Röhrenkammern nach *Utermöhl* [422], bei denen die Sedimentationstiefe den Kammerdurchmesser übertrifft. Ist die auszuzählende Fläche größer als das Dingfeld des Mikroskops, so wird es ohne einen Objektträger mit Netzgravur schwierig, wenn nicht unmöglich, die absolute Teilchenanzahl auf der gesamten Meßfläche zu bestimmen, weil sich die vom Mikroskop überblickten Meßfelder kaum fehlerlos aneinander anschließen lassen, wenn nicht die Meßfeldbegrenzung im Objekt gegeben ist. In solchen Fällen bestimmt man besser die durchschnittliche Teilchenanzahl je Fläche, indem man einzelne Dingfelder auszählt und das Zählergebnis mittelt. Die Ding- bzw. Meßfelder wählt man am besten äquidistant durch entsprechende Verschiebung des Objekttisches oder -führers. Anstelle von einzelnen Meßfeldern kann man auch einen streifenförmigen Bereich quer über die gesamte Meßfläche auszählen.

9.3.1.2. Lycopodiummethode

Ein beliebtes Verfahren zum Bestimmen der Teilchenanzahl in einer bestimmten Masse eines Pulvers besteht darin, einer definierten Menge der Probensubstanz eine gleichfalls bekannte Menge von Lycopodiumsporen zuzusetzen, beide Substanzen gut zu mischen und dann in der Mischung die Anzahl der Lycopodiumsporen und der Teilchen der Probensubstanz zu ermitteln. Auch andere Referenzsubstanzen sind möglich. Aus dem Verhältnis dieser Zahlen berechnet man die Teilchenanzahl je Menge der Probensubstanz, wenn man die Anzahl der Lycopodiumsporen in 1 mg Lycopodiumpulver kennt (etwa $9{,}5 \cdot 10^4\ \mathrm{mg}^{-1}$). *Behringer* [569] beschäftigt sich eingehend mit der Lycopodiummethode und vergleicht ihre Genauigkeit mit der der Zählkammermethode, wobei er findet, daß bei etwa gleicher Genauigkeit der Zeitbedarf für die Lycopodiummethode größer ist. Ein Vorteil der Arbeitsweise mit einer Referenzsubstanz liegt darin, daß – gleichmäßige Mischung vorausgesetzt – normale Objektträger verwendet werden können und die Größe der ausgezählten Fläche nicht bekannt sein muß.

9.3.1.3. Auszählung heterogener Gemenge

Bei zahlreichen Mahlgütern kommt es auf den prozentualen Mengenanteil eines qualitätsbestimmenden Bestandteils an (z. B. Anteil der Schalensubstanz in Kakaopulver, Anteil von verschiedenen Stärkesorten in einer Mischung usw.). In vielen Fällen, besonders in der Nahrungsmittelkontrolle, ist eine chemische Trennung der Gemengeanteile undurchführbar und die mikroskopische Analyse die Methode der Wahl. Zur mikroskopischen Bestimmung der Anteile zählt man die Körner aller Komponenten im gleichen Areal. Die Masseprozente m_i der i-ten Komponente kann man unter Berücksichtigung der Dichten ϱ_j und der mittleren Durchmesser d_j der Komponenten abschätzen:

$$m_i = \frac{n_i \varrho_i d_i^3}{\sum_j^k n_j \varrho_j d_j^3} \, 100\,\% \,; \tag{9.6}$$

k Anzahl der Komponenten,
n_j Anzahl der Körner der j-ten Komponente.

Natürlich haften diesem Verfahren ziemlich große systematische Fehler an. Jedoch ist es für die vergleichende Untersuchung von Gemengen gut geeignet, weil es dort weniger auf genaue Absolutwerte ankommt. Ausführliche Kommentare zu dieser Methode geben *Chamot* und *Mason* [575] sowie *Chayes* [577], der sich besonders mit ihren statistischen und durch die Probenherstellung bedingten Fehlern auseinandersetzt.

9.3.1.4. Genauigkeit mikroskopischer Zählmethoden

Fehler beim Zählen von Teilchen auf einer Fläche beruhen u. a. auf zwei Hauptursachen:
Erstens ist eine ausreichende Sichtbarkeit Voraussetzung für die Zählung eines Teilchens. Besonders bei nichtabsorbierenden Teilchen mit schwachem Kontrast sowie bei Teilchen in der Größenordnung der Auflösungsgrenze wird diese Bedingung oft verletzt, so daß bei der Zählung ein mehr oder weniger hoher Prozentsatz übersehen wird. Eine theoretische und experimentelle Untersuchung des Einflusses von numerischer Apertur des Objektivs, Beleuchtung und Beobachtungsoptik auf die Zählgenauigkeit gibt *Benarie* [570]. Er stellt fest, daß die numerische Apertur die Hauptrolle unter den optischen Einflußgrößen spielt. Mit steigender Apertur werden kleinere Teilchen zählbar.
Die zweite wichtige Fehlerquelle ist das schlechte Gedächtnis des Beobachters. Bei der Bestimmung der Teilchenanzahl auf einer Testfläche durch Okularbeobachtung muß der Beobachter sich merken, welche Teilchen er bereits gezählt hat und welche nicht. Dabei sind gelegentliche Doppelzählungen oder Auslassungen kaum zu vermeiden.

Die Größe dieses Fehlers hängt stark von der Person des Beobachters und von den Arbeitsbedingungen ab. Das Arbeiten in Projektion mit Zählgriffel liefert auf jeden Fall zuverlässigere Werte. Durchschnittlich muß man bei visueller Zählung mit einem Fehler von ± 10 bis 20% rechnen.

9.3.2. Mikroskopische Bestimmung der Korngrößenverteilung

Die Bestimmung der Teilchengrößen von Pulvern oder körnigen Materialien stellt eine häufige und wichtige Aufgabe der angewandten Mikroskopie dar. Es gibt zahlreiche Methoden, die Größe eines mikroskopisch kleinen Korns zu ermitteln [568] [574] [609].

Die indirekten Methoden, z.B. Sedimentation, Coulter-Zählung usw., haben neben Vorteilen, zu denen ihre hohe Arbeitsgeschwindigkeit gehört, einige wesentliche Mängel. Die zugrunde gelegten Gleichungen für den Zusammenhang von Korngröße und Meßwert gelten in der Regel nur näherungsweise. Die indirekten Verfahren bedürfen daher durchweg einer Kontrolle durch direkte mikroskopische Beobachtung.

Die mikroskopische Korngrößenbestimmung stellt nach dem einhelligen Urteil der Fachleute die genaueste Methode der Kornmessung dar. Sie kann im Bereich von 0,5 μm $< d <$ 200 μm mit dem Lichtmikroskop durchgeführt werden. Dazu wird eine kleine repräsentative Probe des dispersen Materials auf Objektträgern präpariert und unter dem Mikroskop ausgemessen. Außer der erreichbaren hohen Genauigkeit bietet die mikroskopische Kornmessung den Vorteil, daß gleichzeitig die Kornform und andere optisch evidente Parameter beurteilt werden können. Dadurch lassen sich z.B. Klumpen, Verunreinigungen, Entmischungen usw. leicht erkennen und berücksichtigen. Besonders bei vergleichenden Untersuchungen ist die mikroskopische Körnungsanalyse unentbehrlich. Der Nachteil der konventionellen mikroskopischen Meßverfahren, daß sie zeitraubend sind und die ständige Anwesenheit eines Beobachters erfordern, wird durch automatische und halbautomatische Hilfsmittel ausgeschaltet.

Vor dem Messen der Korngröße muß zunächst festliegen, was unter einem Korn verstanden werden soll. Je nach der wissenschaftlichen Fragestellung sind verschiedene Auffassungen möglich.

Man definiert: Ein Korn ist der kleinste visuell erkennbare, einheitliche kompakte Körper.

Jeder, der schon mit mikroskopischen Kornuntersuchungen zu tun hatte, weiß, wie problematisch die Unterscheidung von Körnern und Körnerklumpen ist. Jedoch liegt gerade hier ein Vorteil der mikroskopischen Untersuchung, indem sie den Beobachter zu einer entsprechenden Beurteilung zwingt, während bei der Sedimentation und anderen indirekten Verfahren die Kornzusammenballungen unberücksichtigt bleiben, obwohl sie dort natürlich ebenso eine Rolle spielen.

Werden unter dem Mikroskop isolierte Teilchen betrachtet, was in diesem Abschnitt vorausgesetzt wird, so bieten sie dem Beobachter die Projektion ihres Umrisses dar. Aus statischen Gründen liegen die Teilchen meist mit ihrem größten Querschnitt parallel zur Tragglasebene. Bei stark abgeplatteten Körnern (z.B. Glimmer) muß dies beachtet werden. Im übrigen kann man die Teilchen durch Einbettung in ein zähes, schnellerhärtendes Medium daran hindern, ihre stabilste Lage einzunehmen. Die Tiefendimension der Körner ist im Mikroskop schwierig zu beurteilen. Man verzichtet daher in der Regel auf eine Bewertung der Kornausdehnung senkrecht zur Präparatebene und identifiziert das Korn mit seinem Umriß. In diesem Zusammenhang ist eine Erläuterung zur Problematik der Korngrößendefinitionen notwendig. Bei Teilchen zufälliger Gestalt kann die ermittelte Korngröße je nach angewendeter Definition sehr verschiedene Werte annehmen. Demgemäß sind auch die nach verschiedenen Definitionen ermittelten Größenverteilungen im allgemeinen verschieden. Es gibt keine wahre Größenverteilung bei regellos geformten Körnern. Dies gilt für alle Verfahren der Korngrößenbestimmung. Aus praktischen Gründen verdienen die statistischen Größenmaße für statistische Messungen den Vorzug vor den eindeutigen.

In diesem Zusammenhang erscheint auch die Vernachlässigung der Tiefendimension der Körner nicht als Nachteil; sie ist sozusagen Bestandteil der mikroskopischen Korngrößendefinitionen.

Im folgenden seien einige Korngrößendefinitionen für die Mikroskopie kurz besprochen [568] [607] [609] [627].

9.3.2.1. Eindeutige Korngrößenmaße

Die eindeutigen Korngrößenmaße sind unabhängig von der Orientierung des Korns. Ihre

experimentelle Bestimmung ist allerdings meist sehr umständlich. Praktische Bedeutung hat der Durchmesser des flächengleichen Kreises d_F (Bild 9.9):

$$d_F = \sqrt{\frac{4A}{\pi}}; \qquad (9.7)$$

A die vom Kornumriß eingeschlossene Fläche.

9.3.2.2. Statistische Korngrößenmaße

Sämtliche statistischen Durchmesserdefinitionen liefern beim gleichen Korn verschiedene Ergebnisse, je nach Orientierung und – bei d_s – Lage des Korns.

Feretscher Durchmesser d_{Fer} (Bild 9.9)

d_{Fer} ist der Abstand der zwei äußersten Tangenten an ein Teilchen, die parallel zu einer gegebenen Richtung liegen. Der Feretsche Durchmesser gibt besonders die Extremalabmessungen der Teilchen wieder. Man sieht sofort, daß d_{Fer} von der Orientierung des Teilchens abhängt. Andererseits vereinfacht die Beschränkung auf eine gegebene Richtung die Messung erheblich. Man verzichtet also bei Anwendung der Feretschen Durchmesserdefinition auf die (überflüssige) genaue Beschreibung des Einzelkorns zugunsten einer schnelleren Aussage über das gesamte Haufwerk. Dies trifft für alle statistischen Durchmesserdefinitionen zu.

Krummbeinscher Durchmesser d_K (Bild 9.9)

d_K ist die längste Sehne durch das Korn parallel zu einer gegebenen Richtung. Der Krummbeinsche Durchmesser liefert ähnliche Werte wie d_F.

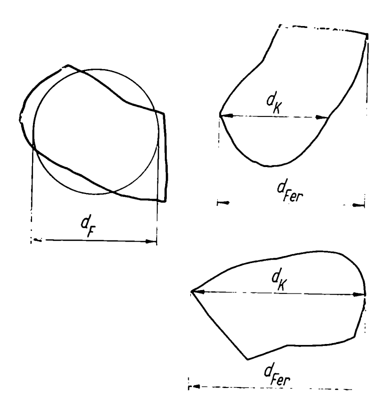


Bild 9.9. Durchmesser des flächengleichen Kreises d_F, Krummbeinscher Durchmesser d_K und Feretscher Durchmesser d_{Fer}, dargestellt an identischen Körnern verschiedener Orientierung

Zufällige Sehne durch das Korn d_s (Bild 9.10)

Während d_K als Sehne noch eine Nebenbedingung erfüllen muß, ist d_s frei von allen Einschränkungen. Man überdeckt das ganze Bild mit einer Schar etwa gleichabständiger Linien. Die Streckenabschnitte, die in den Körnern verlaufen, sind die gesuchten Werte d_s. Je nach Lage und Ausrichtung der Teilchen entstehen verschiedene Sehnen. Diese Korngrößenbestimmung hat unter der Bezeichnung Sehnenschnittverfahren Eingang in die Praxis gefunden [628].
Ausführliche Vergleiche der Eigenschaften der verschiedenen Korngrößendefinitionen geben u. a. [592] [597] [607].

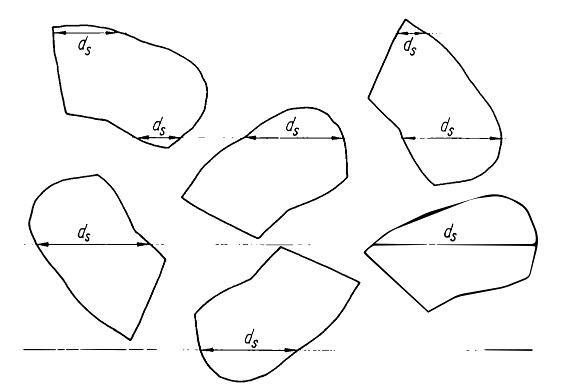


Bild 9.10. Zufällige Sehnen d_s, dargestellt an identischen Körnern verschiedener Orientierung

9.3.2.3. Praktische Korngrößenmeßverfahren

Messung von d_F

Die Messung von d_F läuft gemäß der Definitionsgleichung (9.7) auf eine Bestimmung der Fläche A des Kornbilds hinaus. Hierzu eignet sich prinzipiell jedes der im Abschn. 9.2.3. genannten Verfahren. Am häufigsten wird wohl der Vergleich mit einer Kugel- und Kreisreihe angewendet; vgl. z.B. *Patterson* und *Cawood* [629].
Es ist auch eine Anzahl von halbautomatischen Einrichtungen bekannt, die den Durchmesser des flächengleichen Kreises bequemer zu messen gestatten [587] [607]. Dabei wird ein Vergleichskreis, die Öffnung einer Irisblende, in das Bild des Körnerpräparats abgebildet. Die Irisblende wird so eingestellt, daß ihre Öffnung mit dem zu messenden Korn flächenmäßig übereinstimmt. Die Verstellvorrichtung für die Irisblende ist mit einer Reihe von elektrischen Kontakten gekoppelt, die die Verbindung mit einem der gerade eingestellten Größe

zugeordneten elektrischen Zählwerk herstellen. Durch einen Knopfdruck registriert man das Teilchen in dem seiner Größe entsprechenden Zählwerk.

Messung von d_{Fer}

Hierzu eignen sich besonders Meßschraubenokulare mit aufrechtem Strichkreuz. Der senkrechte Strich wird rechts und links als Tangente an das Korn angelegt. Die Differenz der Einstellungen ist d_{Fer}. Bei liegendem Strichkreuz verfährt man analog und dividiert das Meßergebnis durch $\sqrt{2}$ [643]. Eine weitere einfache Meßmöglichkeit für d_{Fer} bieten alle Okularstrich- oder -netzplatten mit parallelen Linien in gleichmäßigen oder geometrisch wachsenden Abständen. Im Bild 9.11 ist ein Beispiel für eine geometrisch (Modul $\sqrt{2}$) gestufte Skale gegeben. *Schulze* [635] beschreibt eine winkelförmige Lehre, die zur d_{Fer}-Messung geeignet ist.

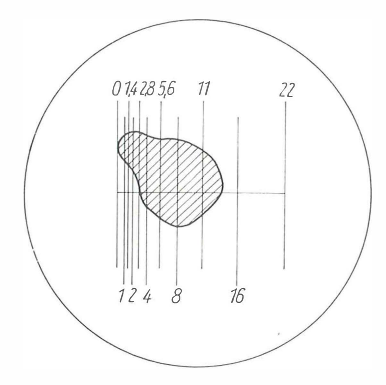


Bild 9.11. Messung von d_{Fer} durch Okularstrichskale

Das Teilchen wird unter Beibehaltung seiner Orientierung mit dem Objektführer parallel zur horizontalen Linie verschoben, bis der eine Rand die Nullinie tangiert. Dann wird abgelesen, in welches Intervall der andere Rand fällt; im Beispiel: $11 < d_{Fer} < 16$. Berücksichtigt werden alle Teilchen, die die horizontale Linie schneiden

Messung von d_K

Eine außerordentlich einfache Bestimmung von d_K – bei großer Genauigkeit – ermöglicht das Bildaufspaltungsprinzip nach *Dyson* (s. Bild 9.6; es ist $d_K = D$). Ein halbautomatisches Gerät nach diesem Prinzip beschreibt *Timbrell* [642].

Messung von d_S

Bei visueller Beobachtung geht man nach Bild 9.12 vor. Dieses einfache Meßverfahren ist besonders leicht der Automatisierung zugänglich.

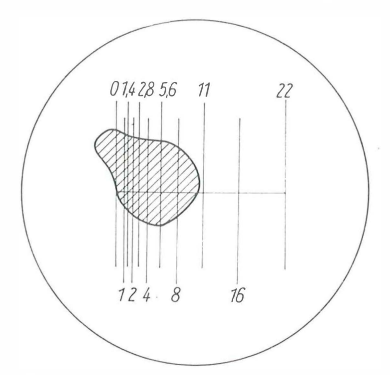


Bild 9.12. Messung von d_S

Das Korn wird unter Beibehaltung seiner Orientierung und seiner Lage zur horizontalen Linie mit seinem linken Rand an den Skalenanfang geschoben. Dann wird abgelesen, in welches Intervall der rechte Rand fällt; im Beispiel: $8 < d_S < 11$. Teilchen, die die horizontale Linie nicht schneiden, werden nicht berücksichtigt

9.3.2.4. Auswertung und Genauigkeit der Korngrößenmessung

Das Ziel einer Korngrößenanalyse ist die Aufstellung eines Histogramms der Teilchendurchmesser, d.h. die Säulendarstellung der Häufigkeiten f_i von Teilchen mit Durchmessern zwischen den Grenzen d_i und d_{i-1} (s. Bild 9.13 a). Über die Begriffe der statistischen Auswertung siehe z.B [616]. Ebenfalls üblich ist die Darstellung der Korngrößenverteilung als Summendiagramm (Bild 9.13 b), Säulendarstellung von

$$F_i = \sum_{j=1}^{i} f_j \,.$$

Dabei kann man die Breite der Größenklassen $d_i - d_{i-1}$ konstant wählen (Bild 9.13 a und b) oder nach einer geometrischen Progression wachsen lassen (Bild 9.13 c und d). Letzteres ist oft vorteilhaft, wenn kleine Teilchen wesentlich häufiger vorkommen als große.

Für viele Anwendungen ist die Verteilung des Volumens des Haufwerks auf die verschiedenen Größenklassen aussagekräftiger als die Häufigkeitsverteilung. Dazu trägt man den Anteil V_i, den Körner aus dem Intervall (d_{i-1}, d_i) am Gesamtvolumen V haben, als Säulendiagramm auf (Bild 9.13 d). Die V_i lassen sich aus den f_i näherungsweise berechnen:

$$V_i = f_i(d_i + d_{i-1})^3 / \sum_j f_j(d_j + d_{j-1})^3 .$$

Es gibt zahlreiche weitere Möglichkeiten zur Gewinnung abgeleiteter Daten aus der Korn-

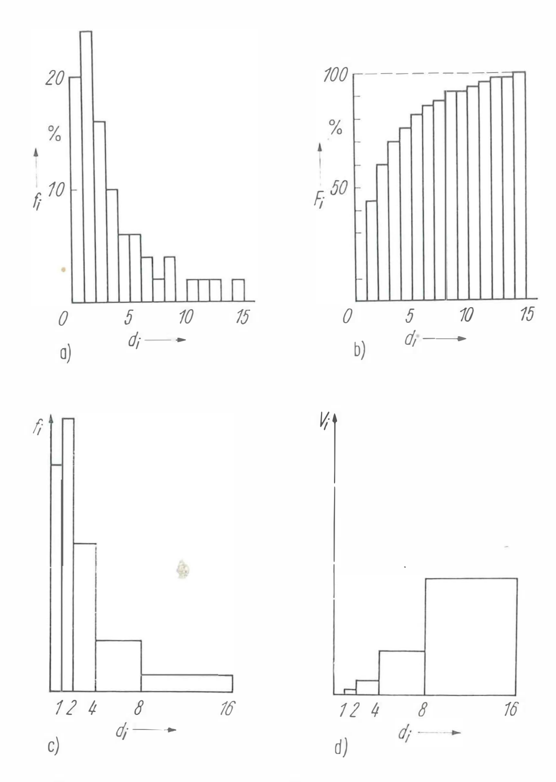


Bild 9.13. Korngrößenverteilungsdiagramme

a) Histogramm einer Korngrößenverteilung;
b) Summendiagramm der gleichen Korngrößenverteilung;
c) Darstellung des Histogramms der gleichen Korngrößenverteilung mit geometrisch wachsender Klassenbreite;
d) zu der gleichen Korngrößenverteilung gehörige Volumen- oder Massenverteilung.

Die Maßstäbe in a), c) und d) sind so gewählt, daß die Flächen der verschiedenen Säulen dem in der Klasse vorhandenen Prozentanteil entsprechen

größenhäufigkeitsverteilung (Berechnung von verschiedenen Mittelwerten, Streuungsmaßen, der spezifischen Oberfläche von Pulvern usw.). Hierzu geben *Chamot* und *Mason* [575] einen ausführlichen Überblick. Zur Beurteilung der Genauigkeit von Korngrößenanalysen sind verschiedene Punkte zu beachten. Zunächst muß man sich über den Einfluß der benutzten Korngrößendefinition auf das Meßergebnis Klarheit verschaffen. Sodann ist zu berücksichtigen, welche Fehler bei der Längen- bzw. Flächenmessung entstehen (siehe Abschn. 9.2.1.3. und 9.2.3.). Ferner gilt für die Korngrößenanalyse als ein Zählverfahren natürlich alles im Abschn. 9.3.1.4. Gesagte; d.h., bei visueller Beobachtung ist ein Zählfehler von $\pm 15\%$ durchaus gewöhnlich (jedenfalls beim Feinanteil). Die automatischen Geräte arbeiten genauer mit etwa $\pm 3\%$ Fehler.

Bei der Korngrößenanalyse muß besonders dafür gesorgt werden, daß das Zählergebnis die wahren Verhältnisse im Haufwerk wiedergibt. Beim Auszählen des Präparats kann man entweder alle Teilchen berücksichtigen, die in einem bestimmten Areal liegen, oder alle Teilchen, die in einem Streifen bestimmter Breite liegen, oder nur diejenigen Teilchen, die eine Linie schneiden (s. Legende zu den Bildern 9.11 und 9.12). Für letztere, sehr zu empfehlende Methode ist eine nachträgliche einfache Korrektur der Größenverteilung notwendig [611].

Schließlich entstehen zufällige Abweichungen bei der Korngrößenanalyse aus statistischen Gründen. Sie sind um so geringer, je größer der Umfang der ausgezählten Probe ist. Die relative Häufigkeit einer Kornfraktion, die einen Anteil von $p\%$ im Haufwerk ausmacht, läßt sich mit einer Standardabweichung von $\sigma\%$ bestimmen, wenn die Probe einen Umfang von insgesamt N Teilchen hat, wobei

$$\sigma = \sqrt{\frac{p\,(100 - p)}{N}} \tag{9.8}$$

gilt. Daraus läßt sich z.B. ablesen, daß bei einem Probenumfang von $N = 1\,000$ Teilchen eine Korngrößenklasse von 10% relativer Häufigkeit mit einer Standardabweichung von etwa 1% bestimmbar ist.

9.3.3. Stereologische Analyse und Gefügeanalyse

Zahlreiche Fragestellungen der Histologie, Metallografie, Geologie usw. führen auf das Problem, aus den in einem Dünnschnitt oder Anschliff vorgefundenen zweidimensionalen Schnittbildern auf die dreidimensionalen Ausgangsstrukturen der kompakten Probe zu schließen.

Für die quantitative Behandlung dieser, d.h. stereologischer Fragestellungen sind vor allem in der Petrografie und der Metallografie verschiedene geometrisch-statistische Verfahren ausgearbeitet worden [633].

9.3.3.1. Bestimmung von Volumenanteilen

Als erster erkannte *Delesse* [581], daß im statistischen Mittel das Teilvolumen V_α, das die Komponente α am Gesamtvolumen V einer Probe einnimmt, sich zu diesem verhält wie der Flächenanteil A_α, den die Schnittbilder der Komponente α

im Schnitt oder Schliff einnehmen, zu dessen Gesamtfläche A. Also

$$V_\alpha : V = A_\alpha : A. \tag{9.9}$$

Rosiwal [632] erweiterte diesen Gedanken, indem er zeigte, daß

$$V_\alpha : V = A_\alpha : A = L_\alpha : L \tag{9.10}$$

gilt, wobei L_α die Summe aller in α verlaufenden Sehnenlängen d_S^α bedeutet, die entstehen, wenn man über die Schliffläche eine Linie der Gesamtlänge L zieht. Schließlich bewies *Glagolev* [593] die Gültigkeit einer weiteren Proportion

$$V_\alpha : V = A_\alpha : A = N_\alpha : N \tag{9.11}$$

mit N = Anzahl von mit überall gleicher Wahrscheinlichkeit statistisch auf der Schnittfläche verteilten Testpunkten und N_α = Anzahl der Treffer auf die Komponente α. In der Praxis erfüllt ein gleichmäßiges Punktnetz die notwendigen Bedingungen. Die Gln. (9.9), (9.10) und (9.11) gelten im statistischen Mittel streng und ohne Rücksicht auf Orientierungen des untersuchten Gefüges. Kommt es nur auf die Bestimmung der Volumenanteile an, so ist die Glagolevsche Methode als die rationellste anzusehen [578] [579] [600] [602] [641] [646].

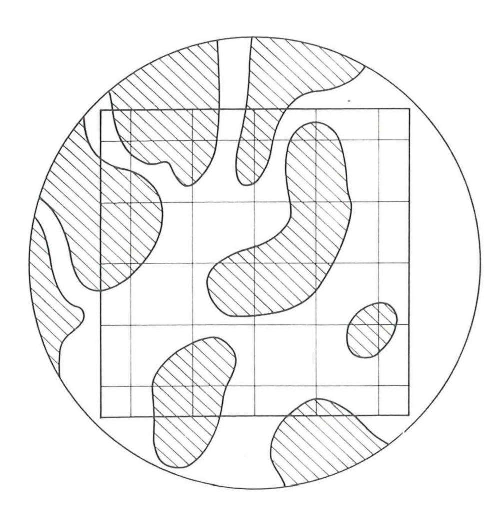


Bild 9.14. Schematische Darstellung eines zweikomponentigen Präparats, überdeckt von einem Liniennetz zur Trefferzählung

Der quadratische Rand begrenzt ein Feld von 25 Flächeneinheiten. Die Gesamtlänge der im Inneren verlaufenden Linien beträgt 50 Längeneinheiten. Die 25 Kreuzungspunkte dienen als Testpunkte.
Im Beispiel fallen 11 Treffer auf die graue Komponente. 29mal schneiden die Netzlinien eine Grenze zwischen den Komponenten

Am einfachsten läßt sich die Punkt- oder Trefferanalyse mit einem Okularnetz durchführen (Bild 9.14). Man wendet die Zählung auf mehrere Dingfelder an, bis man genügend große Zahlen N erreicht hat.

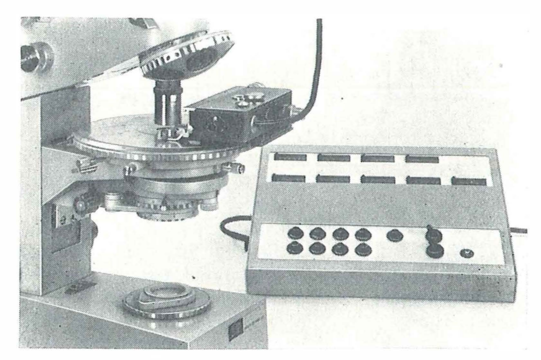


Bild 9.15. Ansicht des Punktzählgeräts ELTINOR 3

Links: Präparatevorschub auf dem Objekttisch
rechts: Zählgerät mit der Drucktastatur
VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow, Werkfoto

Halbautomatische Geräte zur Trefferanalyse sind die sog. Point-Counter. Sie bestehen aus einer Vorrichtung, mit der das Präparat schrittweise in einer Richtung verschoben wird, und einem Zählgerät. Der Präparatvorschub wird durch eine Drucktastatur in Tätigkeit gesetzt. Gleichzeitig wird jeder Knopfdruck, d.h. jeder Schritt, in einem Zählwerk registriert. Dabei wird das mikroskopische Bild mit einem Strichkreuzokular betrachtet. Je nachdem, in welche Komponente der Strichkreuzmittelpunkt fällt, benutzt man zum Auslösen des nächsten Schritts einen dieser Komponente zugeordneten Druckknopf und registriert so in dem entsprechenden Zählwerk. Das erste Gerät dieser Art entwickelte *Glagolev* [594]. Im Bild 9.15 wird eine moderne „Elektrische Integriervorrichtung" ELTINOR 3 gezeigt (Hersteller: VEB Rathenower Optische Werke, Rathenow). Mit einem solchen Gerät erreicht man Dauerleistungen von etwa 3000 Punkten je h.
Mit der Genauigkeit der Methode haben sich u.a. *Glagolev*, *Chayes* [579], *Henning* [602], *Mayhew* [621] und *Greif* [595] befaßt. Zusammenfassend läßt sich dazu sagen, daß die Punktmethode zur Volumenanteilbestimmung keinerlei systematische Fehler induziert. Der statistische Fehler hängt von der verwendeten Gesamttestpunktanzahl N ab und kann nach Gl. (9.8) theoretisch abgeschätzt werden (p ist in diesem Fall der

Volumenanteil der Komponente in %). Empirisch ermittelt man die Standardabweichung wie üblich, indem man die N Testpunkte in kleinere Gruppen (etwa 100) unterteilt. Die Gleichung gilt um so genauer, je unabhängiger die Resultate (d.h. die Aussagen α oder Nicht-α) an den benachbarten Testpunkten untereinander sind. Praktisch bedeutet das: Der Abstand der Testpunkte soll nicht kleiner sein als die durchschnittliche freie Weglänge in der Komponente α bzw. der Umgebung von α, und zwar ist hierbei von der Minderheitskomponente auszugehen. Selbst bei im Mittel gleicher Zusammensetzung der Probe bedingt der körnige Aufbau heterogener Stoffe lokale Variationen der Komposition. Deshalb würde eine übertriebene Genauigkeit beim Ausmessen eines Schnitts nur diese Schwankungen genauer wiedergeben. Für die Aussage über die Gesamtprobe ist es günstiger, 100 Schnitte (falls vorhanden) mit je 25 Punkten zu messen als 10 Schnitte mit 250 Punkten. Wird die Punktzählmethode auf Dünnschliffe endlicher Dicke angewandt, so ist als systematischer Fehler der sog. Holmes-Effekt zu berücksichtigen [579].

9.3.3.2. Bestimmung der Korngröße im Gefüge

Als Maß für die mittlere Korngröße von einphasigen Metallgefügen führte *Heyn* [604] die mittlere Länge der Abschnitte ein, die von einer zufälligen Meßlinie bekannter Länge L in den Körnern verlaufen:

$$d_{\text{Heyn}} = \frac{L}{n}; \qquad (9.12)$$

n Anzahl der Schnitte mit Korngrenzen. Mit d_{Heyn} ist die spezifische Grenzfläche S des Gefüges verknüpft durch

$$S = \frac{2}{d_{\text{Heyn}}}. \qquad (9.13)$$

Diese Definition kann man sinngemäß auf mehrkomponentige Proben übertragen:

$$S_\alpha = \frac{2n_\alpha N}{LN_\alpha}. \qquad (9.14)$$

Dabei bedeuten: S_α spezifische Oberfläche der Komponente α, n_α Anzahl der Schnitte der Linie (Länge L) mit Grenzen der Komponente α. Im Bild 9.14 bedeutet dies $S_\alpha = 2 \cdot 29 \cdot 25/(50 \cdot 11) = 2{,}6$ Flächeneinheiten/Volumeneinheit.
(Damit sind die durch das Zählnetz gegebenen Einheiten gemeint, z.B. sei der Skalenwert des Netzes – identisch mit der Längeneinheit nach Bild 9.14 – gleich 0,125 mm. Dann wird $S_\alpha = 20{,}8$ mm²/mm³.)
Darüber hinaus sind zahlreiche weitere Kombinationen von Trefferzählung, Zählung der Grenzübergänge, Zählung von Durchstoßpunkten usw. möglich (s. z.B. [602] [626] [641]. Bei allen Verfahren – mit Ausnahme der Volumenanteilbestimmung –, die die Schnittereignisse auf einer Linie auswerten (sog. Linearanalyse), ist zu beachten, daß die Ergebnisse von der Orientierung der Linie zur Vorzugsrichtung im Schnitt abhängen.

Für viele Anwendungen ist die Messung der Korngrößenverteilung der räumlichen Körner im Gefüge erforderlich. In diesem Fall ist es besonders problematisch, von der vorliegenden Verteilung der Schnittbilder auf die Verteilung der räumlichen Gebilde zu schließen. Für Kugeln haben zahlreiche Autoren dieses Problem erfolgreich behandelt [567a] [572] [588] [589] [617] [626] [648]. Dabei stellt sich heraus, daß die räumliche Kugelverteilung leichter aus der Sehnenlängenverteilung (s. Abschn. 9.3.2.2.) berechnet werden kann als aus der Flächenverteilung der Anschnitte. Für nichtkugelige Körner, also im Normalfall, empfiehlt sich ebenfalls, die Sehnenlängenverteilung zur Grundlage einer Korngrößenanalyse zu nehmen. In den meisten Fällen gibt die Sehnenverteilung hinreichenden Aufschluß über die Kornverteilung. Im übrigen kann man aus ihr stets eine sog. äquivalente Kugelverteilung berechnen [572].

9.3.3.3. Bestimmung der Nachbarschaftsverhältnisse im Gefüge sowie weiterer Strukturparameter

Zur zahlenmäßigen Beantwortung der Frage, wie intensiv der Kontakt von Körnern eines Gefügebestandteils untereinander sowie mit Körnern anderer Gefügebestandteile ist, zählt man nicht die Anzahl n_α der Schnitte, die die Meßlinie (Länge L) mit sämtlichen Grenzen von α-Körnern bildet. Statt dessen ermittelt man z.B. bei drei Komponenten die Schnittzahlen $n_{\alpha\alpha}$, $n_{\alpha\beta}$, $n_{\beta\beta}$, $n_{\alpha\gamma}$, $n_{\beta\gamma}$, $n_{\gamma\gamma}$ getrennt, je nachdem ob eine Grenze zwei α-Körner, ein α- und ein β-Korn usw. scheidet. Es gilt dann $n_\alpha = n_{\alpha\alpha} + n_{\alpha\beta} + n_{\alpha\gamma}$. Aus den Schnittanzahlen der einzelnen Übergänge lassen sich mit Gl. (9.13) die Flächenanteile berechnen, mit denen sich die verschiedenen Komponenten des Gefüges berühren. Daraus kann man die sog. Proximität [584] oder die Kontinuität [598] ableiten. Diese Parameter stehen u.a. in Zusammenhang mit der elektrischen Leitfähigkeit von Zwei-

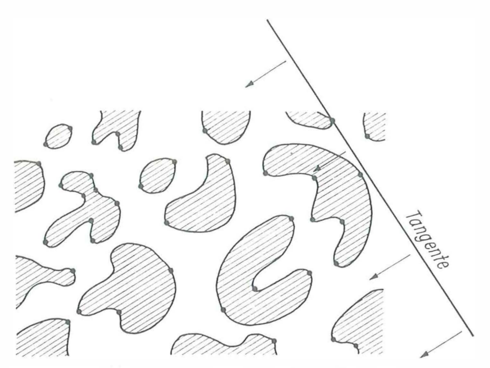


Bild 9.16. Tangentenzählverfahren $T = 39$

Phasen-Legierungen, mit Diffusionsvorgängen und Festkörperreaktionen.
Entscheidenden Einfluß auf chemische Potentiale und Druckdifferenzen in mehrphasigen Gefügen hat die lokale Krümmung von Grenzflächen. Nach *Rhines* kann die mittlere Krümmung dieser Flächen durch ein statistisches Zählverfahren gewonnen werden [605]. Die mittlere Krümmung ist proportional der Anzahl T von Tangenten, die eine über das ebene Gefügebild bewegte Gerade gleichbleibender Richtung mit der Kontur eines Gefügebestandteils bildet (Bild 9.16).
Mitunter ist die Länge einer linienförmigen Struktur (z.B. Länge der Kapillargefäße im tierischen oder menschlichen Gewebe) je betrachtetes Volumen gesucht. Sie ergibt sich aus der Anzahl der im Idealfall punktförmigen Schnittfiguren, die der Linienzug mit der Schnitt- oder Schlifffläche bildet [641] [651].

9.3.3.4. Richtreihenverfahren

Besonders in der Metallografie ist es traditionell üblich, die Flächenanteile, Korngrößen usw. des Schliffbilds durch Vergleich mit einer Reihe von Standardbildern einer sog. Richtreihe zu bestimmen [583]. Zu diesem Zweck sind eine große Anzahl von Vorrichtungen in Gebrauch, die an das Mikroskop angesetzt werden können und die einen bequemen Vergleich des Richtreihenbilds mit dem Bild der Probe ermöglichen, z.B. das Korngrößen-Vergleichsokular nach *Mitsche* und *Grabner* [625].
Die Richtreihenverfahren sind einfach zu handhaben; sie erlauben eine rasche Einstufung der Werkstoffe nach ihrer Qualität. Allerdings darf nicht übersehen werden, daß die Richtreihenverfahren nur grobe, halbquantitative Ergebnisse liefern, die von der Person des Beobachters und dessen Training sowie von zahlreichen anderen Umständen abhängen. Sollen mehrere Parameter gleichzeitig beim Richtreihenvergleich berücksichtigt werden, wird die Methode vollends unpraktikabel. So gesehen, sind auch die staatlichen und internationalen Standards, die auf dem Richtreihenverfahren beruhen, nur ein Notbehelf, der in Zukunft durch Verfahren, wie sie in den vorausgegangenen Abschnitten besprochen wurden (in automatischer oder halbautomatischer Gestalt), verdrängt werden dürfte.

9.4. Probennahme und Präparation

In diesem Abschnitt sollen einige Hinweise auf Präpariermethoden gegeben werden, die den verschiedenen Zähl- und Meßaufgaben angepaßt sind, ist doch eine zweckmäßige und sorgfältige Präparation die Voraussetzung für richtige Meßergebnisse. Ganz allgemein gilt der Grundsatz, daß bei der Präparation dafür Sorge zu tragen ist, daß die Zahl- und Größenverhältnisse in dem zu untersuchenden Stoff im Präparat erhalten bleiben.
Dies gilt z.B. besonders bei der Fixation biologischer Dünnschichtpräparate oder bei der Behandlung der Emulsionen von Automikroradiografien.

9.4.1. Probennahme und Präparation zur Teilchenzählung und Kornverteilungsanalyse

Will man die Teilchenanzahl je bestimmte Masse eines Pulvers über eine definierte Verdünnung bestimmen (s. Abschn. 9.3.1.), so muß die Abmessung der Volumina sehr sorgfältig geschehen. Die Suspensionsflüssigkeit muß so ausgewählt werden, daß ihre Dichte, Benetzungsfähigkeit usw. den entsprechenden Teilcheneigenschaften angepaßt ist, so daß die Teilchen nicht zu schnell aufrahmen oder absinken, keine Zusammenballungen bilden, nicht quellen oder schrumpfen usw. Zu schnelles Sedimentieren oder auch die Brownsche Bewegung bei sehr kleinen Teilchen kann man durch viskose Suspensionsflüssigkeiten verhindern (Zusatz von Gelatine, Glyzerin).
Soll die Korngrößenverteilung gemessen werden, dann ist das Hauptaugenmerk darauf zu richten, daß bei der Probennahme keine Trennung von groben und feinen Teilchen auftritt. Bei Schüttgütern ist die Probenteilung nach dem Kegelverfahren gebräuchlich. „Dazu wird das körnige

Material so aufgeschüttet, daß sich ein Kegel ergibt. Nach dem Aufschütten erfolgt das Aufteilen des Kegels in vier Quadranten derart, daß die Durchdringungsgerade der Teilungsebenen mit der Mittellinie des Kegels zusammenfällt. Von den vier anfallenden Quadranten werden im allgemeinen zwei gegenüberliegende Quadranten neu aufgeschüttet und in erwähnter Art nochmals geteilt. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Probengröße erreicht ist" [568]. Sodann ist für eine gleichmäßige Verteilung der Körner auf dem Präparat zu sorgen. Besonders die großen Teilchen des Haufwerks sind oft ungleichförmig auf dem Präparat verteilt. Bei stark verschiedenen Teilchengrößen ist eine vorherige Fraktionierung durch Sedimentation nützlich. Bei gewachsenen Kriställchen hat man oft einförmige Korngrößen. Dagegen ist es bei Mahlgütern die Regel, daß Körner von einer Maximalgröße an abwärts bis zu kleinsten Partikeln vorkommen, wobei die Häufigkeit nach kleinen Durchmessern hin stark zunimmt.

Für die Teilchenuntersuchung kommen Streupräparate oder Einbettungspräparate in Frage. Streupräparate werden hergestellt, indem man das Pulver auf den angehauchten oder mit einem Haftmittel versehenen Objektträger aufstreut. Nachteil: Es kommen häufig Überlagerungen von Teilchen vor. Streupräparate im weiteren Sinne werden auch mit dem Konimeter und dem Thermalpräzipitator hergestellt [568]. Diese Geräte sind zur Abscheidung von Schwebteilchen aus der Luft geeignet. Ein interessantes Gerät aus der Klasse der sog. Impigner beschreibt *May* [620]. Flüchtige Tröpfchen kann man auf Traggläsern auffangen, die mit MgO- oder NH_4Cl-Rauch bedeckt sind. Sie lassen dort Krater zurück, die zur Messung geeignet sind. Bei Sprühpräparaten (Flüssigkeitsaerosole) ist darauf zu achten, daß die größten Tropfen nicht vom Deckglas gequetscht werden. Sind die Größenunterschiede der Teilchen so bedeutend, daß man mit der Schärfentiefe des Mikroskops in Schwierigkeiten kommt, dann kann man das fertige Körnerpräparat nachträglich senkrecht mit Metall bedampfen. Die Teilchen werden anschließend entfernt. So erhält man ein scharfes und kontrastreiches Schattenbild der Teilchen. Bei schräger Bedampfung läßt sich die Höhe der Teilchen aus dem Schattenbild ermitteln. Staubteilchen aus der Luft können auch in einem kontinuierlichen Absaugverfahren auf einem sog. Molekularfilter (Milliporefilter) abgeschieden werden. Anschließend wird das Filter mit einer Immersionsflüssigkeit von passender Brechzahl getränkt, so daß man die Körner im Durchlicht beobachten kann. Bei den Einbettungspräparaten werden die Körner in einer Flüssigkeit suspendiert. So lassen sich die Teilchen gut verteilen und Agglomerate leicht durch Drehen und Schieben des Deckglases trennen. Außer Wasser und den üblichen Sedimentationsflüssigkeiten kommen als Dispergiermittel besonders Kanadabalsam (nachträgliches Aushärten), geringprozentige Gelatinelösung (mit Deckglas) sowie Zaponlack (Präparat ohne Deckglas) in Frage. Bei der Einbettung in viskose Flüssigkeiten kann man es erreichen, daß z. B. gestreckte Teilchen eine gemeinsame Orientierung bekommen [630].

Zum Ermitteln der Gesamtoberfläche und des Porenvolumens von Schüttgütern kann man folgenden Weg beschreiten: Das Kornmaterial wird in einem aushärtenden Kunstharz eingebettet (Aushärten in der Zentrifuge); von der erstarrten Suspension wird ein Dünn- oder Anschliff hergestellt, und der Schliff wird anschließend nach einer der Methoden aus Abschn. 9.3.3. ausgewertet. Ausführliche Hinweise zur Präparation geben *Batel* [568] und *Cadle* [574].

9.4.2. Probennahme und Präparation zur stereologischen Analyse

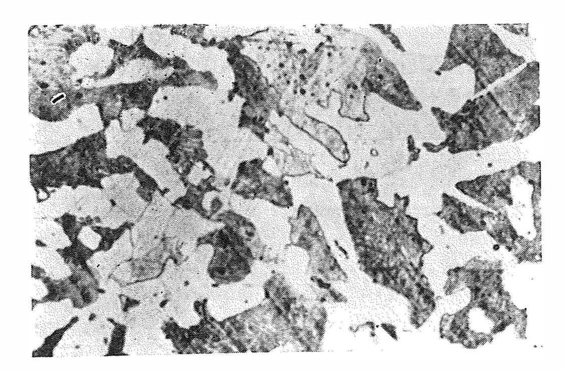
Die stereologische Analyse wird auf Dünnschliffe bzw. -schnitte und auf Anschnitte angewendet. Zur Herstellung dieser Präparate sei auf die Abschnitte 6.1.9. und 6.2.7. verwiesen. Durch geeignete Ätz-, Färbe- und Kontrastmethoden versucht man, stets einen möglichst guten Kontrast zwischen den zu unterscheidenden Komponenten zu erreichen. Bei Durchlichtpräparaten muß wegen des Holmeseffekts [579] die Dicke möglichst gering gehalten werden. Weist die Mikrostruktur der Probe gewisse Vorzugsrichtungen auf (Textur, Regelung), so ist der Schnitt oder Schliff entsprechend zu orientieren.

9.5. Automatische Bildanalyse

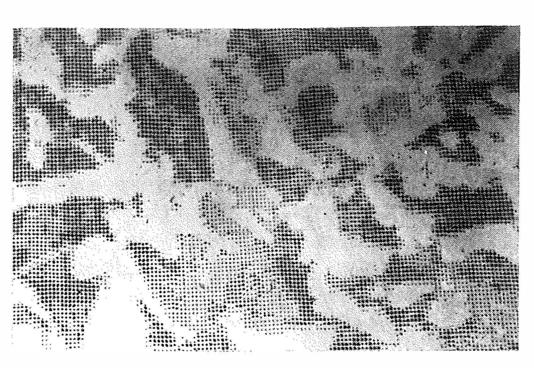
9.5.1. Allgemeines

9.5.1.1. Begriffsbestimmungen

Unter Bildanalyse versteht man quantitative Untersuchungen, die die geometrische Gestalt,



a) Mikrofotografische Aufnahme



b) Digitale Bildmatrix in grauwertähnlicher Darstellung auf einem Zeilendrucker ausgegeben. Rasterpunktabstand 1 µm

Bild 9.17. Stahlgefüge (Ferrit-Perlit)

Größe, Menge oder Anordnung von mikroskopischen Strukturen zum Gegenstand haben. Dabei werden die physikalisch-optischen oder chemischen Materialeigenschaften des einzelnen Bildelements meist als bekannt vorausgesetzt. Durch geeignete Färbung, Ätzung oder optische Kontrastierung werden die stofflichen Eigenschaften der Bildbestandteile in eine Hell-Dunkel-Skale übertragen. Das Maß der Helligkeit eines Bildelements wird als sein Grauwert bezeichnet. Diese Bezeichnung soll ausdrücken, daß es für die Aufgabe der Bildanalyse im Gegensatz zur Fotometrie (s. Abschn. 6.1.7.2.) unerheblich ist, ob als Helligkeitsmaß die im Bild gemessene Lichtintensität, der Transmissions- oder Reflexionsgrad des Objekts oder eine andere Größe verwendet werden, wenn nur der Zusammenhang von Helligkeit und Grauwert eindeutig und reproduzierbar ist. Die in den Abschnitten 9.1. bis 9.3. beschriebenen Methoden der Bildanalyse durch einfache Okularmeßplatten usw., bei denen der Bearbeiter selbst die Messungen ausführen muß, versagen bei massenhaftem Anfall des Untersuchungsmaterials und bei komplexen quantitativ-morphometrischen Fragestellungen (s. Abschn. 9.5.1.4.), so daß dann ein dringendes Bedürfnis nach Automatisierung des Bildanalysevorgangs besteht.

9.5.1.2. Abtastgeräte

Um Bilder automatisch analysieren zu können, muß die Bildinformation in eine dem Automaten verständliche, d.h. digitale, elektrische Form gewandelt werden.

Bei der weitaus häufigsten Art der Wandlung wird das Bild in ein quadratisches Raster von endlich vielen, genügend kleinen Zellen unterteilt. Jeder Zelle wird ihr mittlerer Grauwert zugeordnet. Die Grauwerte werden ebenfalls in endlich viele diskrete Stufen eingeteilt. Oft genügt die Unterscheidung Schwarz – Weiß (Bild 9.17).

Die Rasterung besorgt ein Abtastgerät. Für die Abtastung mikroskopischer Objekte kommen grundsätzlich 3 Anordnungen in Frage.

Beleuchtungsscanning (Bild 9.18)

Bei diesem Verfahren ist das abtastende Element ein kleiner Lichtfleck, der sich in der gewöhnlichen Bildebene eines Mikroskops bewegt. Das Mikroskop wird hier aber umgedreht, also verkleinernd benutzt, so daß die Bildebene die Rolle der Leuchtfeldebene spielt. Dieser sog. flying spot kann z.B. als mechanisch bewegte Lochblende ausgebildet sein oder – wie meist – als Lumineszenzfleck einer Katodenstrahlröhre [622] oder als Fokus eines Laserstrahls, der mit Hilfe bewegter Spiegel verschoben wird [571]. Das damit erzeugte Raster wird durch das umgedrehte Mikroskop stark verkleinert ins Objekt abgebildet. Hinter dem Objekt ist ein Fotoempfänger angebracht, der die durchs Objekt gehende Lichtmenge mißt. Der momentane Meßwert entspricht der Helligkeit der gerade beleuchteten Objektstelle. Er wird digitalisiert und als Grauwert zur Auswertvorrichtung weitergeleitet. Ein Rastergenerator steuert die Bewegung des Lichtflecks. Im Beispiel mit Katodenstrahlröhre liefert er die Ablenkspannungen und gleichzeitig die Lagekoordinaten der jeweils gemessenen Objektstelle.

Das Flying-spot-Mikroskop mit Katodenstrahlröhre gestattet eine ziemlich genaue Grauwertmessung (1 bis 2%) und relativ hohe Abtastfrequenzen (5 bis 10 kHz). Diese und ähnliche

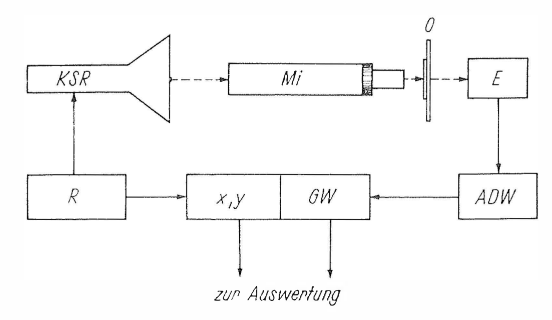


Bild 9.18. Schema Flying Spot

E Fotoempfänger; *R* Rastergenerator; *ADW* Analog-Digital-Wandler; *GW* Grauwert; *O* Objekt; *x y* Lagekoordinaten des Rasterpunktes; → Signalfluß; --→ Lichtfluß; *KSR* Katodenstrahlröhre; *Mi* Mikroskop

Angaben haben die Bedeutung von Bestwerten, die nicht ohne weiteres verknüpfbar sind. Die Grauwertgenauigkeit nimmt i. allg. mit wachsender Geschwindigkeit ab. Die Genauigkeitsangaben für den Grauwert sind so zu verstehen, daß elektronisches Rauschen, Schwankungen der Empfindlichkeit und der Beleuchtungsintensität sowie andere im Gerät begründete Signaländerungen zusammen 1 bis 2% des Vollausschlags ausmachen.
Das Verfahren ist technisch aufwendig.

Objektscanning (Bild 9.19 [652, 653])

Bei diesem Verfahren wird das Objekt mit dem Objekttisch des Mikroskops entsprechend dem gewünschten Abtastmuster elektromechanisch bewegt. Hinter dem Mikroskop befindet sich der Lichtempfänger mit einer Lochblende davor, die nur das Licht von einer kleinen Fläche in der Dingfeldmitte zur Messung gelangen läßt. Die vom Rastergenerator gesteuerte Tischbewegung bringt nacheinander alle Objektpunkte an die

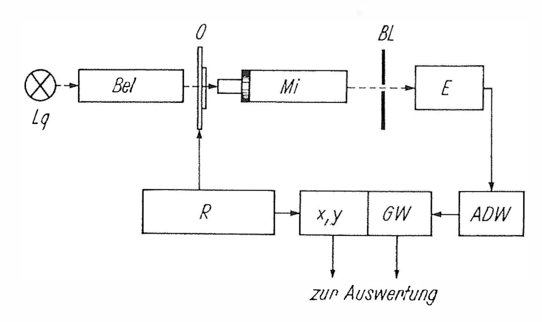


Bild 9.19. Schema Objektscanning

Lq Lichtquelle; *Bel* Beleuchtungseinrichtung; *Bl* Meßblende; sonst wie Bild 9.18

Meßstelle. Dieses Verfahren arbeitet zwar langsam (Punktfolgefrequenzen < 1 kHz), aber es liefert die genauesten Grauwerte (0,5 bis 1%), denn der Meßstrahlengang verläuft unabhängig von den gewählten Objektkoordinaten stets symmetrisch zur optischen Achse des Mikroskops, wodurch beste und gleichbleibende optische Bedingungen eingehalten werden. Geräte nach diesem Prinzip werden deshalb bevorzugt, wenn der Schwerpunkt der Aufgabenstellung bei fotometrischen Daten liegt (vgl. Abschn. 6.1.7.2.). Der materielle Aufwand ist i. allg. geringer als bei Flying-spot-Geräten.

Bildscanning (Bild 9.20)

Das Bildscanningschema erfordert keinen speziellen optisch-mechanischen Aufbau. Das durch das Mikroskop vergrößerte Bild des Objekts wird von einem Bildempfänger abgetastet. Als Bildempfänger verwendet man vorwiegend Fernsehkameraröhren. Neuerdings hat man Imagedissectoren erfolgreich eingesetzt. Geräte nach dem Prinzip

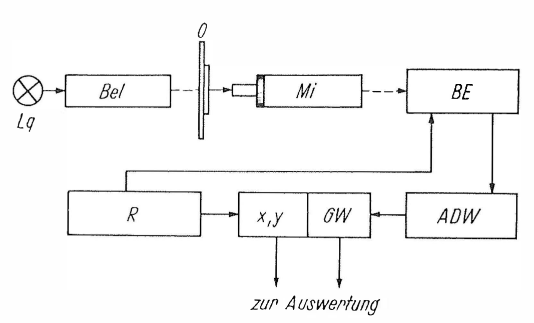


Bild 9.20. Schema Bildscanning

BE Bildempfänger; sonst wie Bild 9.18

des Bildscanning – oft kurz quantitative Fernsehmikroskope genannt – zeichnen sich durch Punktfolgefrequenzen von einem bis zu einigen MHz aus. Die Anpassung an beliebige Spezialmikroskope (z. B. Interferenzmikroskop) oder andere optische Geräte (z. B. Episkop) ist einfach zu verwirklichen. Die erreichbare Grauwertgenauigkeit beträgt 2 bis 5%. Bildscanningmikroskope sind ähnlich aufwendig wie Flying-spot-Mikroskope.
Alle drei Verfahren sind grundsätzlich für Auf- und Durchlicht realisierbar.
Eine wichtige Gerätekonstante eines Mikroskopobjektabtasters ist dessen Auflösungsvermögen. Es wird bestimmt durch den Durchmesser des Beugungsscheibchens des optischen abbildenden Systems, durch den auf die Objektebene bezogenen

Durchmesser der abtastenden Sonde (Lochblende; Lumineszenzfleck) und durch den Rasterpunktabstand. Prinzipiell kann man die beiden letzten Einflußgrößen durch optische Mittel soweit verkleinern, daß das Gesamtauflösungsvermögen dem des Mikroskops allein gleichkommt. Ein derartiger Abtaster würde jedoch sehr lange Meßzeiten benötigen. Deshalb strebt man einen praktisch optimalen Kompromiß an, so daß die Beträge aller drei genannten Einflußgrößen ungefähr gleich werden. Dabei verschlechtert sich das Auflösungsvermögen der Gesamtanlage auf 50 bis 70% des sonst erreichbaren Grenzwerts. Bei einem Mikroskopobjektiv der numerischen Apertur 1,3 wäre demnach ein Rasterpunktabstand von 0,1 bis 0,2 µm bezogen aufs Objekt sinnvoll. Beim Flying-spot- und Fernsehschema läßt sich dieses Maß mit optischen Mitteln leicht verwirklichen. Dagegen bereitet im Fall des Objektscanningverfahrens eine Verringerung der Schrittgröße $< 0{,}5$ µm Schwierigkeiten.
Jeder der drei besprochenen Abtastertypen hat also charakteristische Vorzüge und Nachteile und damit auch im speziellen Fall seine Berechtigung zur Anwendung.

Vorzüge eines Mikroskopabtasters

In einigen Bildanalysesystemen werden mikrofotografische Negative auf Kleinbildfilm als Eingangsmaterial benutzt [614] [615]. Das ist fotometrisch weniger schwierig als die unmittelbare Abtastung von Mikropräparaten. Außerdem erschließt ein Filmabtaster die ganze Vielfalt bildanalytischer Anwendungen, da alle Bilder auf Film übertragen werden können.
Dennoch wird der Mikroskopiker die Abtastung des Originalpräparats meist vorziehen, da bei vielen Anwendungen die zusätzliche Anfertigung einer Mikrofotografie unerwünscht ist. Bei der Fotografie sind gewisse Informationsverluste unvermeidlich: Die Grauwertabstufung wird verfälscht, das Auflösungsvermögen verringert sich, es entsteht ein zusätzliches Rauschen und man muß mit einer Verlagerung der Konturen im Bild rechnen. Durch die fotografische Aufnahme verliert der Bearbeiter auch die wichtige Möglichkeit, bei Bedarf das Objekt in einer anderen Ebene scharfzustellen, gewisse Artefakte visuell zu erkennen und überhaupt in Zweifelsfällen anhand des Präparats Entscheidungen zu fällen, die das Foto allein nicht zuläßt. Schließlich kostet die Filmaufnahme einen Teil der Zeit, die durch die Automatisierung gewonnen werden kann.

9.5.1.3. Methoden der automatischen Bildauswertung

Nach der Rasterung wird die digitale Bildmatrix einem Auswerteautomaten zugeführt.
Grundsätzlich ist jede Bildanalysenaufgabe, die man „eindeutig beschreiben" kann, durch einen Automaten lösbar, sofern dieser nur einen genügend großen Speicher hat und genügend Zeit zur Verfügung steht. Durch den Stand der Technik und die Kosten wird jedoch das Repertoire der z. Z. handelsüblichen Mikroskopbildanalysatoren eingeschränkt. Typische Operationen sind (Bild 9.21):
Zählung von Objekten (Teilchen, Einschlüssen, Zellkernen usw.), Messung der Fläche, der Konturlänge oder bestimmter Durchmesser von Objekten; Häufigkeitsverteilung solcher Größen; Berechnung von Formfaktoren (z. B. das Verhältnis des Quadrats der Konturlänge zum Flächeninhalt); Anzahl möglicher Tangenten bestimmter Richtung an die Objektkontur; Berechnung des Mittelwerts und der Streuung des Grauwerts von Objekten mit granuliertem Grauwert u. a. m.
Zur Ermittlung derartiger Parameter ist z. B. ein elektronischer Kleincomputer mit etwa 8 bis 16 k

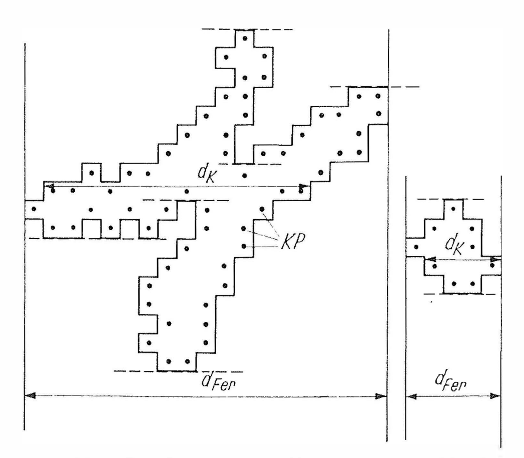


Bild 9.21. Schematische Darstellung zweier Objekte nach der Rasterung mit einigen eingezeichneten geometrischen Kenngrößen, die leicht automatisch bestimmbar sind.

Anzahl der Objekte 2

Fläche A	105	14
Konturlänge = Anzahl der Konturpunkte KP		
KP	61	9
d_K	14	4
d_{Fer}	19	5
Anzahl horizontaler Tangenten	6	2
KP^2/A	35,5	5,8

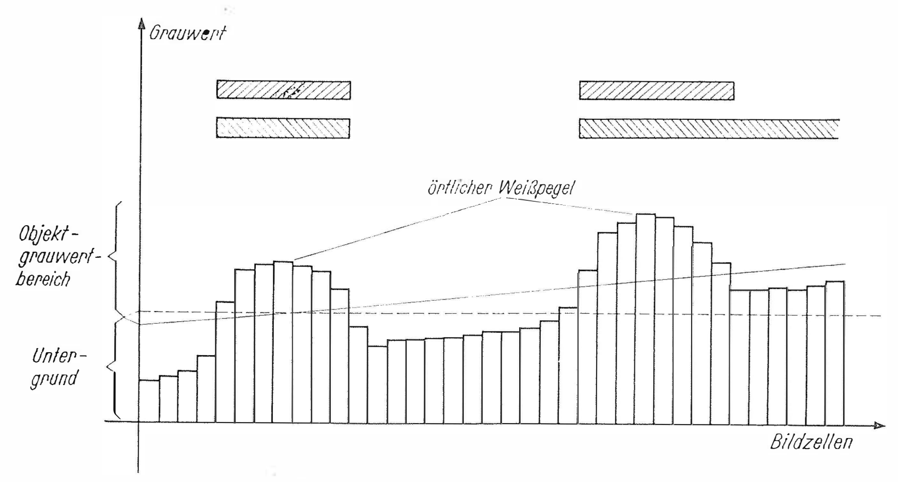


Bild 9.22. Wirkung des Schwellwertkriteriums

Als Objekt erkannt ////// bei angepaßter Schwelle, —— angepaßte Schwelle
Als Objekt erkannt \\\\\\\\ bei fester Schwelle, ----- feste Schwelle

Worten Speichergröße (1 k = 2^{10} = 1024 Speichereinheiten) und 12 bis 16 bit Wortlänge imstande [612] [652]. Bei größerem rechentechnischem Aufwand gelingt es u.a., die Länge der Fortsätze an Nervenzellen automatisch zu vermessen [614] [615], Leukozyten aufgrund der Gestalt und Größe des Zellkerns sowie der Granulation des Plasmas automatisch zu klassifizieren [608] [622] oder Chromosomen zu identifizieren gemäß ihrer Größe, dem Armlängenverhältnis usw. [614] [622].

Die Algorithmen zur automatischen Gewinnung der gewünschten Angaben aus der unverdichteten Bildinformation sind je nach der Aufgabe sehr verschieden.

Bei einer großen Klasse von Algorithmen wird die digitale Bildmatrix zeilenweise verarbeitet. Von jeder Bildzelle wird zunächst festgestellt, ob sie zu einem interessierenden Objekt gehört oder nicht. Das geschieht bei der Mehrzahl der Geräte aufgrund des Grauwerts der Bildzelle. Liegt er in dem für Objekte definierten Bereich, so hat man es mit einem Objektpunkt zu tun. (Man verwendet die Begriffe Bildelement, -zelle, Raster- und Bildpunkt synonym.) Dieser Bereich muß durch vorbereitende Untersuchungen vom Bearbeiter (oder vom Automaten selbst!) ermittelt werden. Der Bearbeiter gibt die Bereichsgrenzen vor Beginn der Analyse in den Automaten ein. Das so beschriebene Schwellwertkriterium zur Objektdetektion ist technisch leicht zu realisieren, aber störanfällig. Bei Präparaten, die nicht gleichmäßig gefärbt oder geätzt sind, bei ungleichmäßiger Schnittdicke oder ungleichmäßiger Ausleuchtung führt es zu Fehlern. Aus diesem Grund wird gelegentlich mit automatischer oder halbautomatischer Schwellwertkorrektur gearbeitet [644]. Dabei stellt sich der Schwellwert in verschiedenen Gebieten des Bilds von selbst auf einen Pegel ein, der den dort herrschenden Werten von Untergrundhelligkeit und Kontrast angepaßt ist (Bild 9.22). Aber auch das derart verbesserte Schwellwertkriterium ist bei vielen Präparatarten prinzipiell nicht geeignet, die Objektpunkte vom Untergrund zu trennen, z.B. wenn Objekt und Untergrund sich nicht durch ihren mittleren Grauwert, sondern durch eine charakteristische Granulation oder Streifung, zusammenfassend Textur genannt, unterscheiden. Dann führt oft eine statistische Analyse der Grauwerte einer gewissen Nachbarschaft der gerade betrachteten Bildzelle zum Ziel (Texturfilterung [606]). Nachdem eine Bildzelle als Objektpunkt erkannt wurde, verknüpft der Automat diese Aussage mit den entsprechenden Aussagen der Nachbarpunkte (Bild 9.23). Je nach dem angetroffenen Punktmuster werden bestimmte Ereignisse festgestellt und gezählt (z.B. die Randpunkte). Die erhaltenen Teilsummen und andere Kennzahlen werden bei jeder neuen Zeile auf den aktuellen Stand gebracht. Schließlich bildet der Automat daraus die gewünschten Resultate. Eine interessante Variante der zeilengeführten Bildanalyseverfahren wurde in der Ecole de Mines in Paris erarbeitet [637]. Dabei wird das gesamte Bild mit Hilfe eines sog. Strukturelements transformiert. Das Strukturelement besteht aus einer wählbaren

Betrachtete Punktgruppe	festgestelltes Ereignis	mögl. Auswertergebnisse	Anwendungen
a) laufende Zeile → 2 oder mehr benachbarte Punkte der gleichen Zeile	O L Beginn eines Objekts; L L Punktgruppe im Objekt; L O Ende eines Objekts	Linearanalyse	Stereologische Analyse von Metallen, porösem Material usw.
b) vorhergehende → laufende Zeile Einige benachbarte Punkte in 2 oder mehr benachbarte Zeilen	O O / O L Beginn eines Objekts. Der aktuelle Punkt ist Konturpunkt; O O / L L Punktgruppe liegt am oberen Rand eines Objekts; O L / O L Punktgruppe am linken Rand eines Objekts; O L / L L Der aktuelle Punkt ist kein Konturpunkt und liegt im Ineren des Objekts	Zählung, Größen- und einfache Formanalyse an getrennt liegenden Objekten unter günstigen Bedingungen hinsichtlich Krontrast usw.	Analyse von Pulverteilchen
c) größere Punktgruppen über mehrere Zeilen	z.B. radiale Anordnung von Grauwertgradienten im Bild beim Gradientenfilterverfahren [11]; Grauwertisolinie	Erkennung und Auswertung komplizierter Strukturen, auch einfacher Strukturen unter erschwerten Bedingungen	Analyse kugeliger Objekte mit wechselndem Kontrast, ungleichmäßigem Untergrund und Berührungen
	Testpunkt erfaßt keinen radialen Grauwertgradienten		

Bild 9.23. Schematisierte Beispiele zur zeilengeführten Bildverarbeitung

→ Richtung der Abarbeitung; //////// Objekt; *L* Objektpunkt; *O* Untergrund; * aktuelle Bildpunkte

Anzahl und Anordnung von Nachbarpunkten des aktuellen Bildpunkts. So erhält man aus dem ursprünglichen Bild Punktmengen, die in enger Beziehung zu stereologischen Kenngrößen des Untersuchungsgegenstands stehen.

Ist für die Lösung einer Bildanalyseaufgabe die Kenntnis des gesamten Verlaufs des Umrisses der Objekte nötig (z.B. bei Chromosomen), so empfiehlt sich statt der zeilenweisen Verarbeitung des Bilds die sog. Konturfolgung (Bild 9.24). Dabei sucht der Automat so lange zeilenweise, bis er ein Objekt gefunden hat. Die Verarbeitung folgt dann der Kontur des Objekts. Wenn die gesamte Kontur abgefahren und registriert ist, wird die Suche nach weiteren Objekten fortgesetzt [614]. Durch diese Methode kann Speicherplatz im Automaten gespart werden. Der Vorteil entsteht allerdings nur dann, wenn die Konturfolgung bereits bei der Abtastung einsetzt, d.h., wenn der Abtaster das Bild nicht zeilenweise abrastert, sondern die Abtastsonde selbst der Kontur folgt und deren Koordinaten ermittelt. Die objektfreien Präparatstellen werden überhaupt nicht gemessen. Dazu muß ein Abtaster vorhanden sein, bei dem die Position der Abtastsonde vom Auswertautomaten frei gesteuert werden kann. Zusätzlich wird eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der Positionierung und der Grauwertmessung verlangt.

Ein steuerbarer Abtaster erhöht die Flexibilität der Bildverarbeitung in mehrfacher Hinsicht. Damit läßt sich z. B. durch Variation der Meßdauer für den Grauwert einer Bildzelle das unterschiedliche Signal/Rausch-Verhältnis in verschieden hellen Bildbereichen ausgleichen.

Grundsätzlich können die geschilderten Auswertverfahren ebenso durch speziell entwickelte, festverdrahtete elektronische Schaltungen (s. Abschnitt 9.5.2.2.) wie durch Universalrechner realisiert werden [622]. Der Vorzug der Spezialrechner liegt in ihrer hohen Arbeitsgeschwindigkeit. Sie sind jedoch nur eingeschränkt programmierbar. Universalrechner lassen sich durch geeignete Software-Programme optimal an das Anwendungsproblem anpassen. Auch nach der Anschaffung der Apparatur können neu auftretende Aufgaben durch neue Programme gelöst werden. Bildana-

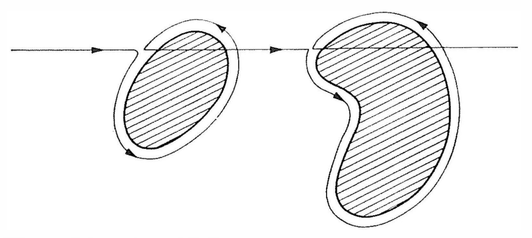


Bild 9.24. Konturfolgung

lyse mit höherem Kompliziertheitsgrad (z.B. Chromosomenuntersuchung) ist im wesentlichen dem Universalrechner vorbehalten. Vorteilhaft ist oft eine Kombination beider Konstruktionsprinzipien.
Fast alle handelsüblichen Automaten zur Bildanalyse enthalten außer optischen Mitteln zur Objektbeobachtung einen elektronischen Bildschirm, auf dem der abgetastete Präparateausschnitt dargestellt werden kann (Bild 9.25). Außer der Wiedergabe des grauwertähnlichen Bilds (wie beim gewöhnlichen TV-Mikroskop, s. Abschnitt 8.5.) können auf dem Bildschirm Flächen, Linien und Punkte, die für den gerade laufenden Auswertprozeß charakteristisch sind, durch Helltastung hervorgehoben werden.

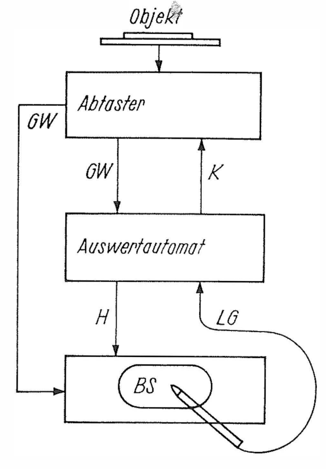


Bild 9.25. Blockschema eines Bildanalyseautomaten mit Display
GW Grauwert; *K* Steuerkommandos; *H* Helltastung von Bildelementen; *LG* Lichtgriffeleingabe; *BS* Bildschirmgerät

Beispiel: Nach der Ermittlung der Kontur eines Objekts gibt der Automat die Konturlinie grafisch aus.
Umgekehrt kann der Bearbeiter mit einem Lichtgriffel auf dem Bildschirm Objekte oder beliebige Punkte antasten. Dabei erfaßt der Auswertautomat die Koordinaten des angetasteten Punkts und modifiziert die Auswertung entsprechend. Welche Wirkung im Einzelfall eine Lichtgriffeleingabe hat, hängt natürlich vom gerade benutzten Auswertprogramm ab.
Beispiel: Ein Objekt, das den angetasteten Punkt enthält, wird nicht ausgewertet.
Ein Bildschirm mit Möglichkeiten der grafischen Ein- und Ausgabe erlaubt die visuelle Kontrolle des Auswertevorgangs sowie korrigierende Eingriffe. Das ist wichtig, da die gegenwärtigen Verfahren der automatischen Bildanalyse viele Störeinflüsse nicht fehlerlos bewältigen. So können etwa atypische Objekte oder Präparierfehler von der Auswertung ausgeschlossen werden. Auch die Einstellung der optimalen Schwellwerte für die Objektdetektion wird mit Hilfe eines Bildschirms bequemer.
Trotz erstaunlicher Leistungen in einigen Fällen [615] [636] kann der Entwicklungsstand der automatischen Bildanalyse gegenwärtig noch nicht befriedigen.
Die Schwäche der Automaten besteht hauptsächlich darin, daß sie bei Abweichungen der Präparate von idealisierten Bedingungen (Kratzer, Staub, unvollkommene Ausbildung der Objektmerkmale [Bilder 6.232 u. 6.234], wechselnde optische Abbildungseigenschaften [Bild 3.15], Überlagerung störender Strukturen usw.) die gegebene Ausnahmesituation nicht selbständig erkennen und zweckmäßig reagieren.

9.5.1.4. Nutzen der automatischen Bildanalyse für die praktische Mikroskopie

Erhöhte Genauigkeit

Bei visuell durchgeführter Bildauswertung, z.B. Teilchenzählung oder Trefferanalyse, schwankt die von verschiedenen Beobachtern erzielte Genauigkeit infolge unterschiedlicher Sehtüchtigkeit, Sorgfalt oder Auslegung des Einstellkriteriums. Auch bei demselben Beobachter differieren die Genauigkeiten in Abhängigkeit vom Grad der Konzentration bzw. Ermüdung. Die entstehenden Fehler sind sowohl systematischer als auch statistischer Natur (vgl. Abschnitte 9.2.3., 9.3.1.4., 9.3.2.4.). Dagegen hängen die durch Automaten erhaltenen Analysenergebnisse vom Bearbeiter nur wenig ab.
Die Reproduzierbarkeit wird erhöht. Durch automatische Teilchenzählung z.B. können die Zählfehler auf 2 bis 3 % herabgedrückt werden (vgl. Abschn. 9.3.1.4.).

Verbesserte Arbeitsbedingungen

Die Durchführung visueller Bildanalysemethodeu weist i. allg. einen geringen Anteil geistig schöpferischer Arbeitsgänge auf in Verbindung mit hohen Anforderungen an Konzentration und Sehleistung. Für Routinebearbeiter müssen wegen der damit gegebenen körperlichen Belastung

Kurzarbeit und besondere Arbeitspausen vorgesehen werden. Durch Bildanalyseautomaten wird die Tätigkeit für den Bearbeiter weniger ermüdend und zumutbar.

Mehr Information

Automaten versetzen den Untersucher in die Lage, zahlreiche quantitative Merkmale von Bildstrukturen gleichzeitig zu sammeln, arithmetisch zu kombinieren und statistisch zu verarbeiten. An jedem Objekt eines Bilds können z. B. Fläche, Länge der Kontur, maximale Sehne, Grauwertstreuung usw. zahlenmäßig bestimmt werden, eine sonst praktisch kaum durchführbare Aufgabe. Durch geeignete rechnerische Merkmalauswertung kann ein Automat u. U. in einer dem visuellen Anschein nach homogenen Zellpopulation verschiedene Zellklassen unterscheiden [652].

Schnelleres Messen und Auswerten

Vergleicht man die für die gleichen Untersuchungsaufgaben von einem Menschen und von einem automatischen Bildanalysator benötigten Zeiten, so ergibt sich im Durchschnitt für den Automaten eine beachtliche Überlegenheit. *Ledley* [614] gibt für die automatische Aufstellung eines Karyogramms 20 s an. Manuell durchgeführt beansprucht diese Arbeit mehrere Stunden. Je nach Lage der Dinge bewegt sich der Zeitgewinn zwischen dem 10- bis 1000fachen.

Man kann die Faustregel aufstellen, daß die automatische Bildverarbeitungsmaschine überall dort dem Menschen überlegen ist, wo die Objektdefinition relativ klar liegt und die Analyse überwiegend die quantitative Bestimmung geometrischer, fotometrischer und statistischer Kenngrößen enthält. Der Mensch ist im Vorteil, sobald die Problematik der Objektdefinition im Vordergrund steht. Zusammenfassende Darstellungen aus dem Gebiet der automatischen Bildanalyse geben [580] [610] [613] [615] [622] [636] [638].

9.5.1.5. Bemerkungen zur Präparation für automatische Bildanalyse

Zunächst bleibt alles im Abschn. 9.4. Gesagte gültig. Durch die Automatisierung der Bildauswertung erhält jedoch die Präparationsproblematik einige spezifische Akzente. Grundsätzlich bereiten alle Störungen im Präparat (Schmutzteilchen, ungleichmäßige Färbung, Zusammenballung von Objekten) der automatischen Auswertung Schwierigkeiten. Die dabei entstehenden Fehler des Analyseergebnisses können praktisch nur ausnahmsweise durch höheren Aufwand im Auswertalgorithmus beseitigt werden. Die Präparation muß dem Automaten entgegenkommen.

Das bedeutet z. B. für Auflichtpräparate: Kratzer und Reliefbildung sind zu vermeiden. Bei Abtastern mit automatischer Präparatverschiebung dürfen z. B. Schliffe nur innerhalb der Schärfentiefe von der Ebene abweichen, es sei denn, es steht eine automatische Fokussiereinrichtung zur Verfügung. Für Teilchenpräparate oder zytologische Ausstriche muß man fordern, daß die interessierenden Objekte nicht zusammengeballt sind. Das wird in einigen Fällen durch chemische Behandlung und Ultraschalleinwirkung erreicht. Gewebedünnschnitte müssen zur automatischen Auswertung gleichmäßig dick sein. Künstlich gefärbte oder geätzte Präparate dürfen keine Schwankungen der Farbintensität aufweisen. Die chemischen Färbe- und Ätzreaktionen sind so auszuwählen, daß sich der Grauwert der zu untersuchenden Objekte maximal von dem anderer Objekte abhebt [596] [618] [623]. Um diese Forderungen zu erfüllen, ist es mitunter nötig, konventionelle Präparationsrezepte zu verlassen und eigens für die automatische Auswertung zweckmäßige Verfahren und Vorrichtungen zu entwikkeln.

So liefert die Firma Corning Glass Works zu ihrem Differentialblutbild-Automaten LARC ein Präpariergerät, in dem durch Zentrifugalkraft eine gleichmäßige Schicht von Blutzellen erzeugt wird, wobei beschädigte und überlagerte Zellen sehr selten vorkommen.

Dieser Auffassung wird allerdings von einigen Autoren widersprochen [652]. In der Tat sind gerade Arbeitsstellen mit routinemäßiger Bilddiagnostik an der Beibehaltung einmal eingeführter Präparationsmethoden interessiert, schon wegen der Vergleichbarkeit mit Archivmaterial und mit anderen Labors. In Stahlwerken ist es üblich, die Proben zur Ausgangskontrolle gerade so weit zu polieren, daß die Prüfung für den Menschen durchführbar wird, d. h., relativ grobe Mängel am Schliff sind zugelassen. Es ist jedoch grundsätzlich günstiger, den Aufwand zur Bildanalyse auf alle Stufen des Prozesses gleichmäßig zu verteilen: Präparation – Abtastung – Auswertelogik – Nachverarbeitung. Jedenfalls müssen für die automatische Bildverarbeitung die Präparationsbedingungen konstant und reproduzierbar sein. Die Forderungen der Bildanalyseautomaten an die Präparation werden am besten durch Präparierautomaten zu erfüllen

sein, bei denen Qualität und Quantität der erzeugten Präparate den Leistungen des Verarbeitungssystems angepaßt sind [624].

9.5.2. Geräte zur automatischen Bildanalyse

Die ersten industriellen Entwicklungen, in denen Bildanalyseaufgaben automatisiert wurden, betrafen die Probleme der Teilchenzählung und der Gefügeanalyse in Gestalt der Linearanalyse. Bei einigen Teilchenzählgeräten wurden speziell geformte Abtastblenden verwendet, um bereits während der Abtastung Elementaraussagen über die Teilchengröße o.a. Merkmale zu gewinnen [592] [601] [610].
Diese Geräte besaßen in der Regel eine fest verdrahtete Auswertelektronik. Sie benutzten oft eine eigene, nur für das betreffende Verfahren gültige Korngrößendefinition. Neben der mechanischen Abtastung (Objektscanning [592] [601]) spielte schon früh das Flying-spot-Verfahren mit Katodenstrahlröhre eine wichtige Rolle [582]. In den 60er Jahren wurden Katodenstrahlabtaster die bevorzugten Bildeingabegeräte für die Analyse auf großen Rechenanlagen [614] [622]. Ein derartiges sehr leistungsfähiges System, CYDAC (CYtophotometric DAta Conversion), wurde von der Firma Airborne Instruments Laboratory, USA entwickelt [622]. Abgetastet werden mikroskopische Originalpräparate. Der Rasterpunktabstand (Auflösungsvermögen) beträgt minimal 0,25 μm, die Punktfolgefrequenz 6 kHz. Die fotometrische Genauigkeit wird mit 1% angegeben. Die Bildmatrix kann auf Magnetband zwischengespeichert oder unmittelbar in einen IBM 7040 eingegeben werden. Das System wurde auf Leukozyten und Chromosomen angewandt.
Ein anderes Gerät zur Analyse von Blutzellen ist das CELLSCAN-System der Firma Perkin Elmer, USA [608]. Es hat einen mechanischen Mikroskopabtaster. Er ist nach dem Bildscanningprinzip aufgebaut und arbeitet mit zwei schwingenden Spiegeln, deren Drehachsen zueinander senkrecht liegen, so daß eine zweidimensionale Abtastung erreicht wird. Die Verarbeitung erfolgt zunächst in einem fest verdrahteten Rechner, wobei ausnahmsweise ein hexagonales Raster zugrunde liegt. Die damit gewonnenen Merkmale werden anschließend in einem frei programmierbaren Rechner einem automatischen Klassifizierungsprozeß unterworfen. Das Gerätesystem hat eine automatische Präparatverschiebung sowie eine automatische Fokussierung.

Aus der Vielzahl weiterer Geräte zur automatischen Bildverarbeitung sollen im folgenden zwei herausgegriffen und genauer beschrieben werden.

9.5.2.1. Der automatische Gefügeanalysator EPIQUANT

Wie schon bemerkt, gehörten Linearanalysatoren zu den ersten halb- [590] oder vollautomatischen [585] Bildanalysegeräten. Das EPIQUANT des VEB Carl Zeiss JENA ist ein moderner Vertreter dieser Gruppe [591]. Seine bevorzugten Einsatzgebiete sind die stereologische Untersuchung von Metallen, Keramik und biologischen Geweben.
Das EPIQUANT besteht aus einem Mikroskopobjektabtaster und einer fest verdrahteten elektronischen Verarbeitungseinheit. Der Abtaster ist nach dem Objektscanningprinzip aufgebaut (vgl. Abschn. 9.5.1.2.). Ein stark vereinfachtes Schema des optischen Strahlengangs ist im Bild 9.26 enthalten. Eine Ansicht des gesamten Systems ist im Bild 9.27 dargestellt. Das Mikroskop selbst gehört zum Le Chatelierschen Bautyp und ist in erster Linie für Auflichtbeleuchtung eingerichtet (s. Abschn. 4.5.1.). Es erlaubt die Beobachtungsverfahren Hellfeld, Dunkelfeld, Polarisation und Interferenzkontrast. Zur Beleuchtung wird eine stabilisierte Halogenlampe von 100 W verwendet, um bei der Messung ein gutes Signal/Rausch-Verhältnis zu erreichen. In der Beleuchtungseinrichtung befindet sich eine kleine Vorblende wählbarer Größe, die in die Objektebene abgebildet wird. Sie bewirkt eine Herabsetzung des Streulichts und dient damit der Verbesserung der fotometrischen Genauigkeit (vgl. Abschn. 6.2.5.2.).
Das vom Objekt reflektierte Licht gelangt durchs Objektiv und über weitere Abbildungsschritte zur Bildebene. Dort befindet sich die kreisförmige Meßblende MB. Es stehen verschieden große Meßblenden zur Verfügung, um das Abtastauflösungsvermögen den unterschiedlichen Objekten und Meßaufgaben anpassen zu können.
Dies geschieht außerdem durch die Wahl des im Meßstrahlengang wirksamen Abbildungsmaßstabs. Der kleinste Meßblendendurchmesser beträgt auf die Objektebene bezogen 0,2 μm. In dieser Größenordnung liegt auch das höchste Auflösungsvermögen des Geräts. Die Meßblende kann gemeinsam mit dem Bild des Objekts beobachtet werden. Dadurch hat der Bearbeiter stets die Kontrolle über ihre momentane Lage im Gefügebild. Das ist z.B. für die Schwellwerteinstellung an kleinen Objekten wichtig. Deshalb sind beim EPIQUANT die Meßblenden als

Spiegel ausgeführt, die in der Mitte eine kleine durchlässige Stelle haben. Das durchgehende Licht dient zur Grauwertmessung, das reflektierte Licht gelangt zur visuellen Beobachtung.

Der Objekttisch wird mit elektrischen Schrittmotoren angetrieben. Die Schrittgröße beträgt 0,25 μm. Da mit dem Gerät ausschließlich linearanalytische Kenngrößen gemessen werden, findet keine lückenlose quadratische Rasterung des Bilds statt, z.B. im Bild 9.17, sondern das Objekt wird längs 25 geraden Linien verschoben (vgl. Bild 9.23 a), die in mäanderförmiger Ordnung auf-

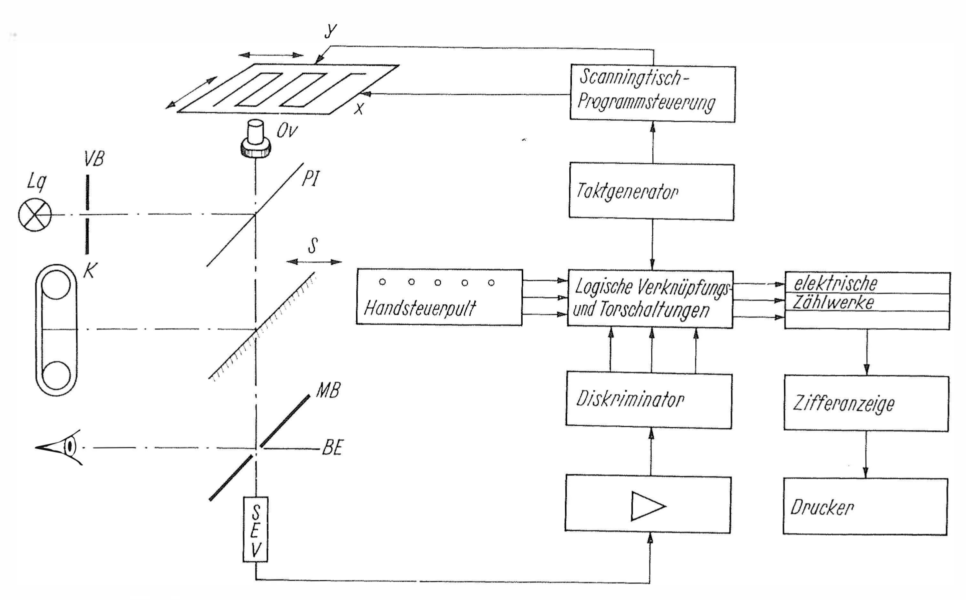


Bild 9.26. EPIQUANT, Blockschema

Lq Lichtquelle; *VB* Vorblende; *Ov* Objektiv; *PI* Planglasilluminator; *K* Kleinbildkamera; *S* ausschaltbarer Spiegel; *MB* Meßblende; *BE* Bildebene

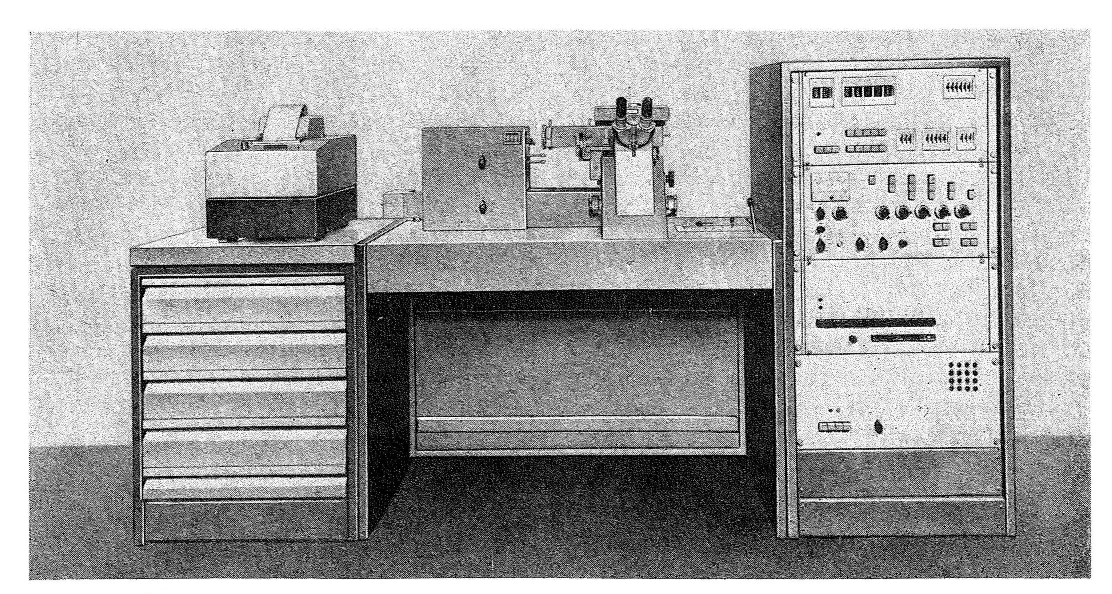


Bild 9.27. EPIQUANT, Ansicht

In der Mitte der Abtaster mit dem Mikroskop. Rechts die Auswerteinheit

VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

einander folgen. Das EPIQUANT verfügt über eine große Auswahl von Festprogrammen zur Tischsteuerung, mit deren Hilfe die 25 Linien in ihrer Länge variiert und auf verschieden große quadratische Meßfelder verteilt werden können. So läßt sich die Länge L der Meßlinie der gewünschten statistischen Sicherheit und der Korngröße des Untersuchungsmaterials anpassen. Die Bewegungsgeschwindigkeit des Scanningtischs muß dem Lichtangebot angepaßt werden, das u.a. durch das Reflexionsvermögen des Objekts, die Größe der Meßblende und den Abbildungsmaßstab bestimmt wird. Sie ist maximal auf 1 mm/s einstellbar.
Die Messung des durch die Meßblende tretenden Lichtstroms geschieht mit einem Sekundärelektronenvervielfacher mit nachfolgendem Verstärker. Letzterer befindet sich, wie auch die folgenden Geräteteile, in der elektronischen Verarbeitungseinheit. Zur Identifizierung des gerade abgetasteten Objekts wird das verstärkte Signal einem Schwellwertdiskriminator zugeleitet (vgl. Abschnitt 9.5.1.3.). Er hat fünf einstellbare Schwellen und erlaubt die gleichzeitige automatische Erkennung und Verarbeitung dreier Bestandteile des Präparats, die sich genügend im Reflexionsvermögen unterscheiden.
Die Gewinnung der linearanalytischen Daten wird durch eine Folge von Taktimpulsen vermittelt. Diese Impulse sind mit den Schritten der Motoren am Scanningtisch synchron. Um z.B. die Länge L_α des in der Komponente α eines Präparats zurückgelegten Weges festzustellen, verfährt der Automat folgendermaßen: Beim Eintritt der Meßblende in die Komponente α öffnet der Diskriminator ein elektrisches Tor. Das bleibt solange geöffnet, wie die Komponente α vorliegt. Es läßt die eintreffenden Taktimpulse zu dem der Komponente α zugeordneten Zähler passieren. Am Ende der Messung gibt der Zählerstand die gesuchte Länge L_α in Vielfachen des Impulsabstands an. Unter dem Impulsabstand versteht man dabei den zwischen zwei Taktimpulsen zurückgelegten Weg. In ähnlicher Weise gewinnt das Gerät alle wichtigen Grundgrößen der Linearanalyse, nämlich: Die im Präparat zurückgelegte Gesamtstrecke L; die davon auf verschiedene Gefügebestandteile entfallenden Anteile L_α, L_β, L_γ; die Anzahlen n_α, n_β, n_γ der Korngrenzen oder anderer Trennlinien und Zwischenräume, die diese Streckenanteile L_α usw. im allgemeinen in viele kleinere Abschnitte zerlegen; sowie die im Abschn. 9.3.3.3. definierten Sequenzzahlen $n_{\alpha\alpha}$, $n_{\alpha\beta}$, usw. Für einen der drei Gefügebestandteile kann außerdem die statistische Verteilung der in dessen Körnern durchlaufenen Sehnenlängen (d_s, S. 405) automatisch aufgenommen werden. Die Registrierung erfolgt in 13 Größenklassen, die geometrisch mit dem Modul $\sqrt{2}$ gestuft sind.
Die Auswahl und Zusammenstellung der verschiedenen fest verdrahteten Grundfunktionen der Auswertelektronik besorgt der Bearbeiter mit Hilfe entsprechender Schalter. Die Resultate eines Programmlaufs können an einem Ziffernfeld abgelesen oder auf einem Meßwertdrucker ausgegeben werden. Der Anschluß eines EDV-gerechten Lochstreifenstanzers ist ebenfalls möglich.
Als Anwendungsbeispiel ist im Bild 9.28 ein Anschliff von Grauguß mit Kugelgraphit dargestellt. Dieses Präparat wurde auf dem EPIQUANT vermessen. Die Gesamtlänge der Meßlinie betrug 20 cm. Davon entfallen 10,8% auf Graphit. Es wurden $n_\alpha = 608$ Graphitpartikel geschnitten. Die Verteilung der Schnittlängen ist im Bild 9.29 wiedergegeben. Die Meßdauer betrug 40 s.
Aus den vom EPIQUANT gelieferten Grundgrößen können nun zahlreiche weitere stereologische Parameter berechnet werden, so die mittlere Sehnenlänge (d_{Heyn}, S. 409), spezifische Oberflächen (S. 409), mittlere freie Weglänge [598], Proximität (S. 409) usw. Die Sehnenlängenverteilung kann unter bestimmten Voraussetzungen in eine räumliche Durchmesserverteilung umgerechnet werden (s. S. 409). Die Formeln dazu sind sehr einfach [572]. Ein besonders wichtiges Kennzeichen von Gefügen ist ihre Gerichtetheit. Bei vielen Materialien, z.B. Walzgut, sind die Körner mehr oder weniger gestreckt und parallel zu einer Vorzugsrichtung angeordnet. Die Zählwerte für n_α usw. werden in solchen Fällen verschieden sein, je nachdem die Meßlinien parallel oder senkrecht zur Vorzugsrichtung verlaufen. Setzt man die Zählwerte ins Verhältnis, so erhält man eine Maßzahl für die Anisotropie (auch Umformgrad) des Materials. Derartige Messungen sind am EPIQUANT sehr erleichtert, da mit einem Knopfdruck die Zeilenrichtung des Scanningtisches in bezug auf das Präparat um 90° geschwenkt werden kann, ohne die übrigen Bestimmungsgrößen des Mäandermusters zu ändern oder das Präparat selbst zu drehen.
Schließlich sei noch auf eine sehr nützliche Betriebsart des EPIQUANT hingewiesen, bei der die Entscheidung über das Vorliegen einer bestimmten Komponente vom Bearbeiter selbst getroffen wird. Der Scanningtisch verschiebt das Präparat mit mäßiger Geschwindigkeit. Dabei blickt der Bearbeiter ins Mikroskop. Stellt er

fest, daß die Meßblende in die Komponente α des Präparats eintritt, so drückt er die entsprechende Taste eines Steuerpultes. Die Auswertlogik verarbeitet die Tastensignale genauso wie die Diskriminatorensignale beim vollautomatischen Betrieb. Auf diese Weise werden auch sämtliche oben genannten Grundgrößen der Linearanalyse automatisch registriert. Die halbautomatische Arbeitsweise ermöglicht die schnelle und bequeme Linearanalyse bei Präparaten, deren Bestandteile sich durch ihren Grauwert nicht eindeutig unterscheiden, oder bei sonstiger ungenügender oder komplizierter Objektdefinition.

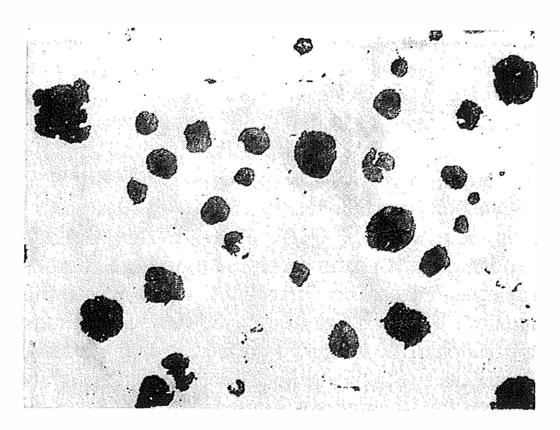


Bild 9.28. Grauguß mit Kugelgraphit M = 100:1

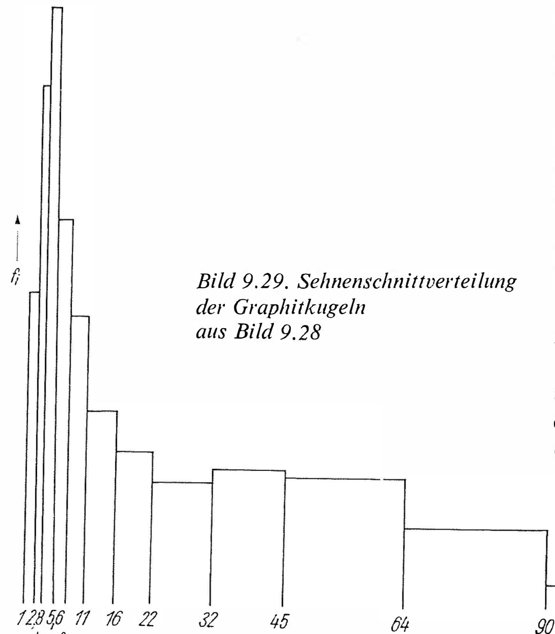


Bild 9.29. Sehnenschnittverteilung der Graphitkugeln aus Bild 9.28

9.5.2.2. Der automatische Bildanalysator QUANTIMET

Das von der Firma IMANCO in Melbourne, England, hergestellte QUANTIMET ist z.Z. das bekannteste Gerät zur vollautomatischen, mikroskopischen Bildanalyse. Die neueste Version, QUANTIMET 720, hat eine beachtliche Leistungsfähigkeit erreicht.

Der Abtaster des QUANTIMET 720 ist nach dem Bildscanningprinzip aufgebaut (vgl. Abschnitt 9.5.1.2., Bild 9.20).

Dementsprechend kann die Abtasteinheit außer an Mikroskope u.a. auch an ein Epidiaskop, an Dia- oder Filmprojektoren sowie an ein Gerät zur Beobachtung von Petrischalen angesetzt werden. Die Rolle des Bildempfängers übernimmt beim QUANTIMET 720 eine Fernsehkamera, die mit Vidicon oder Plumbikon ausgerüstet werden kann. Da die Detailauflösung und die Grauwertgenauigkeit normaler Fernsehkameras für die quantitative Bildauswertung nicht ausreichen, hat der Hersteller des QUANTIMET eine eigene, verbesserte Kamera entwickelt. Sie benötigt für die Abtastung eines Bilds 0,1 s im Gegensatz zu 1/50 s beim normalen Fernsehen. Um die stets vorhandenen Ungleichmäßigkeiten der Lichtempfindlichkeit auf verschiedenen Stellen der Signalplatte von Kameraröhren zu verkleinern, werden die am Röhrenausgang erhaltenen Grauwerte erst über einen sog. shading corrector geleitet. Dieser muß mit dem objektfreienStrahlengang geeicht werden, bevor die eigentliche Messung beginnt. So wird schließlich eine recht gute, gleichmäßige Grauwertgenauigkeit erzielt. Im Unterschied zum EPIQUANT findet beim QUANTIMET eine lückenlose, rechtwinklige Rasterung des Bilds statt. Der Rasterpunktabstand kann durch einfachen Vergrößerungswechsel bequem variiert und auch wesentlich kleiner als das mikroskopische Auflösungsvermögen gemacht werden. Die Feststellung eines interessierenden Objekts basiert beim QUANTIMET auf dem Schwellwertkriterium (s. Abschnitt 9.5.1.3.). Allerdings läßt sich das Gerät mit einem sog. auto detector ausrüsten, der die Fehler des Schwellwertverfahrens reduziert. Zur Korrek-

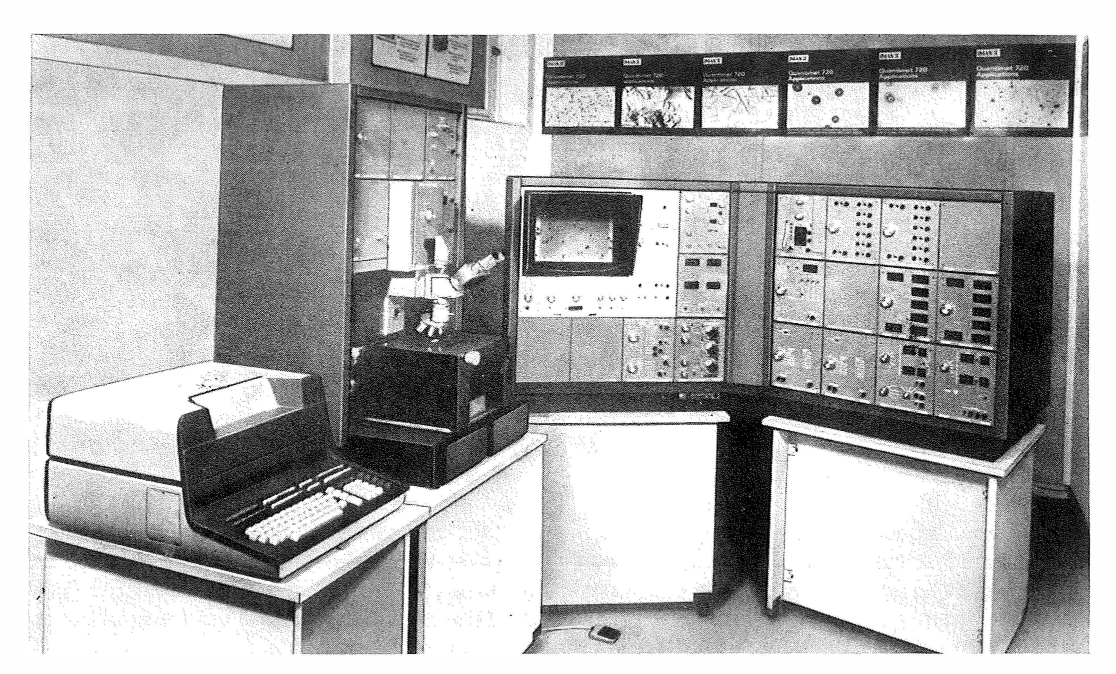


Bild 9.30. QUANTIMET 72 IMANCO
Werkfoto

tur des Schwellwerts zieht der 2 D-auto detector die 24 nächsten Nachbarn des aktuell abgetasteten Rasterelements heran sowie den örtlich vorhandenen Weißpegel [644] (vgl. a. Abschn. 9.5.1.3.). Das nunmehr vollständig digitalisierte Bild kann zur Verarbeitung mit Softwaremethoden in einen Universalrechner eingelesen werden, z. B. PDP 11. Typisch für das QUANTIMET ist jedoch die Verarbeitung in einem eigenen, festverdrahteten Bildanalysecomputer. Dieser nutzt die hohe Abtastgeschwindigkeit der Fernsehkamera voll aus. Sofort nach der Abtastung stehen die errechneten Resultate zur Verfügung. Die mathematische Analyse der Bildstruktur erfolgt zeilengeführt und berücksichtigt mehrere benachbarte Punkte in benachbarten Zeilen (Bild 9.23 b). Dergestalt lassen sich außer stereologischen Kenngrößen des Gesamtbilds auch solche Merkmale gewinnen, die sich auf individuelle Objekte im Bild beziehen, also Anzahl, Flächengröße, Umfang usw. einzelner Teilchen. Die Objekte können automatisch nach der Größe und nach bestimmten Formkriterien klassifiziert werden.

Die verschiedenen Auswertfunktionen des Geräts sind in zahlreichen Bausteinen lokalisiert, die der Anwender sich nach Wunsch zusammenstellen kann. Während einer Bildabtastung können immer nur wenige Auswertfunktionen gleichzeitig ablaufen. Es ist möglich, daß mehrere verschiedene Funktionen automatisch nacheinander durchgeführt werden. Um ihre Reihenfolge und Parameter festzulegen, müssen Kontaktstifte in ein Programmierfeld eingeschraubt werden. Das System enthält schließlich einen Bilddisplay mit Lichtgriffel. In Verbindung mit einem Imageeditor können darauf außer dem Originalbild zahlreiche Zusatzinformationen sowie veränderte Bildstrukturen angezeigt werden.

Auf die Schilderung weiterer interessanter Eigenschaften und Zusatzgeräte des QUANTIMET 720 wird aus Platzgründen verzichtet. Eine mögliche Ausbaustufe ist im Bild 9.30 dargestellt.

10. Mikroskopie unter besonderen Temperatur- und Umweltbedingungen

von Dipl.-Phys. *Manfred Neupert*

Bei der Beobachtung von Objekten mit dem Mikroskop interessiert in den meisten Fällen deren Verhalten, Struktur o.ä. unter normalen Umweltbedingungen, d.h., Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Druck und Atmosphäre entsprechen den am Einsatzort des Geräts vorliegenden Werten. Häufig will man jedoch auch unter Bedingungen arbeiten, denen ein mikroskopisches Objekt während seiner Existenz oder im Verlauf bestimmter Prozesse unterliegt. Unter den veränderbaren Parametern spielt die Temperatur die wichtigste Rolle; weiterhin sind die Art der Gassphäre, der Druck und die Luftfeuchtigkeit im Objektraum als solche zu werten. Es ist das Ziel dieser Darlegungen, dem Leser einen Überblick über das gesamte Gebiet und die Aufbauprinzipien typischer Geräte und Versuchseinrichtungen zu vermitteln.

10.1. Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie

Hoch- und tieftemperaturmikroskopische Untersuchungsmethoden dienen der Erforschung oder Prüfung des Verhaltens mikroskopischer Objekte bei Erhitzung und Abkühlung unter dem Mikroskop. Grenzfälle der Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie sind jene Verfahren, bei denen Objekte aus Biologie und Medizin bei Temperaturen beobachtet werden, die nur wenig ober- oder unterhalb der Raumtemperatur am Einsatzort des Mikroskops liegen. Im Bild 10.1 ist eine Zusammenstellung der bei hoch- und tieftemperaturmikroskopischen Untersuchungen gebräuchlichen Gerätetypen wiedergegeben. Man findet fünf größere Anwendungsbereiche, wobei sieben in Aufbau und Arbeitsweise erheblich unterschiedliche Gerätegruppen benutzt werden. Zur gewählten Terminologie sind noch einige Bemerkungen anzufügen. Als *Temperiereinrichtungen* werden Bauformen bezeichnet, in die man entweder Teile des Mikroskops einbaut oder die auf handelsübliche Mikroskop-Objekttische aufgesetzt werden, während *Heiz-* und *Kühltische* diesen vor allem hinsichtlich der Lage der Objektebene und der Wechselbarkeit gleichen. Demgegenüber wird die Zusatzbezeichnung – *Kammer* – dann angefügt, wenn das Präparat in der Heiz- oder Kühleinrichtung innerhalb eines gegen die Umwelt abgeschlossenen Volumens angeordnet ist. Ehe auf das Instrumentarium der Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie eingegangen wird, sollen zunächst in zwei einführenden Abschnitten Fragen der Temperaturmessung und der Energieübertragung angeschnitten werden.

10.1.1. Temperaturbestimmung

[654] [655] [656] [681] [698] [723] [761]

Die *Temperatur* ist eine der fundamentalen Größen gebräuchlicher Maßsysteme.

Sie ist eine thermodynamische Zustandsgröße und charakterisiert den Wärmezustand eines Körpers. Der direkten Messung entzieht sie sich und wird als Ursache anderer, meßbarer Wirkungen nachgewiesen. Grundlage der Temperaturmessung ist die empirisch bestätigte Tatsache, daß es zwischen unterschiedlichen, thermischen Zuständen eine eindimensionale Ordnung gibt, die z.B. durch eine *Temperaturskale* widergespiegelt werden kann. Deren Festlegung und Kalibrierung gehen von reproduzierbaren Wärmezuständen – den durch Gesetze und internationale Verträge verankerten Festpunkten der Internationalen Temperaturskale – aus [761]. Die bekannteste Art der Skalenteilung stammt von *Celsius*, während in angelsächsischen Ländern noch heute die Temperaturskale nach *Fahrenheit* im Gebrauch ist. Aufgrund theoretischer, thermodynamischer Betrachtungen modifizierte *Lord Kelvin* die Celsiusskale. Der Nullpunkt dieser sog. absoluten, thermodynamischen Temperaturskale fällt mit dem absoluten Nullpunkt ($-273{,}15°C$) zusammen. Man bezeichnet neuerdings die Einheit dieser thermodynamischen Temperaturskale mit dem Symbol K (Kelvin) ohne Gradangabe.

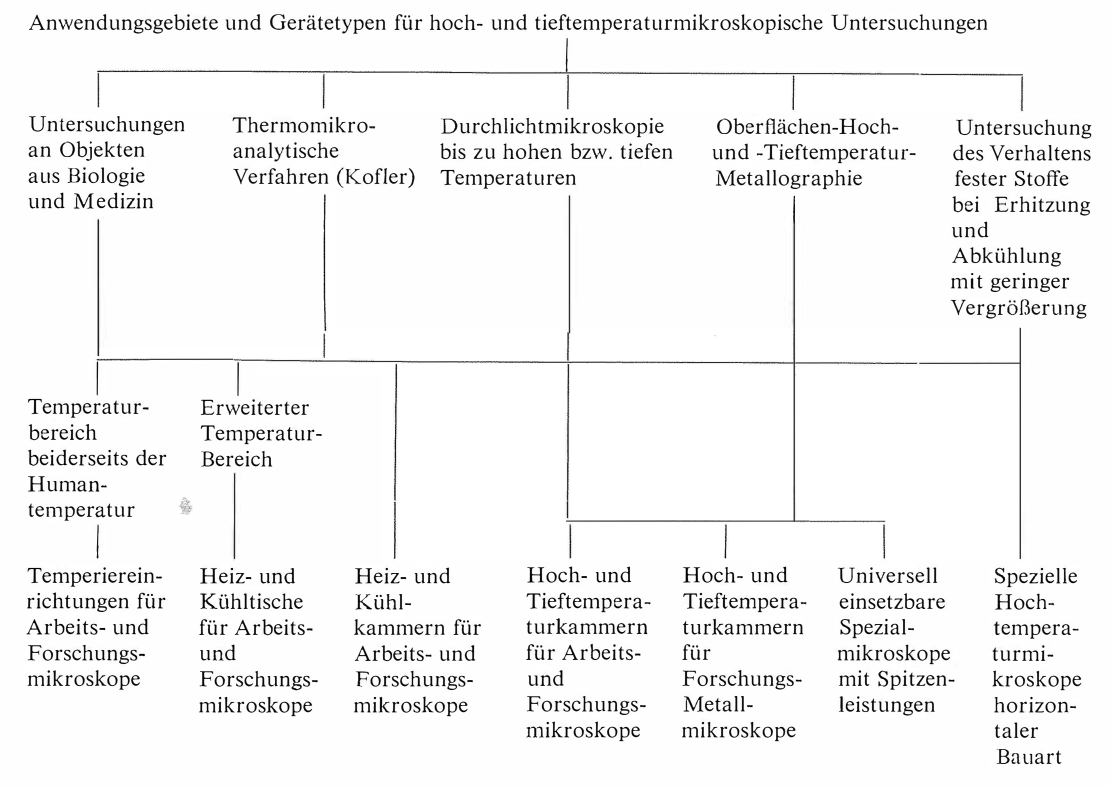


Bild 10.1 Anwendungsbereiche und Gerätetypen für hoch- und tieftemperaturmikroskopische Untersuchungen

10.1.1.1. Temperaturmeßmittel

Die für die praktische Thermometrie eingesetzten Temperaturmeßmittel mit ihren Anwendungsbereichen sind im Bild 10.2 wiedergegeben, wobei die Pfeile Hinweise auf die in Einzelfällen genutzten Temperaturgebiete geben [761].
Durch die Besonderheiten des Aufbaus hoch- und tieftemperaturmikroskopischer Einrichtungen ist von vornherein zu erwarten, daß nur einige der angeführten Meßmittel für die Temperaturmessung in Frage kommen. Vorbedingung ist in erster Linie, daß der Meßfühler klein ist und eine geringe Wärmekapazität (s. Abschn. 10.1.2.) hat, um zu gewährleisten, daß das vorliegende Temperaturfeld durch den Meßfühler möglichst wenig geändert wird [681] [693] [761]. Dieser Forderung entsprechen in erster Linie elektrische Berührungsthermometer (Widerstandsthermometer, Thermoelemente); sie werden deshalb in der Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie vorwiegend eingesetzt. Selten kommen Strahlungspyrometer zur Anwendung, obwohl sie berührungslos messen und deshalb an sich eine Vorzugsstellung einnehmen müßten [675].
Mechanische Berührungsthermometer haben im allgemeinen eine zu große Wärmekapazität, um exakte Temperaturmessungen an mikroskopischen Objekten vornehmen zu können.
Widerstandsthermometer bestehen aus dem Meßwiderstand und einer entsprechenden Anzeigeeinrichtung. Während noch vor etwa einem Jahrzehnt vorwiegend Platin- oder Nickeldrähte den relativ großflächigen Meßfühler bildeten, ist es in den letzten Jahren gelungen, für technische Messungen ausreichend alterungsbeständige Halbleitermeßfühler geringer Größe zu entwickeln. Für Temperaturmessungen am mikroskopischen Objekt sind die Meßfühler von Widerstandsthermometern trotzdem noch zu groß; man verwendet sie jedoch zuweilen, um aus der Temperaturbestimmung in Objektnähe auf die Objekttemperatur selbst zu schließen.
Die Herstellung nahezu beliebig kleiner Meßfühler gelingt bei Thermoelementen. Wie die Widerstandsthermometer ermöglichen auch sie eine Fernübertragung des Meßwerts. Als *Thermo-*

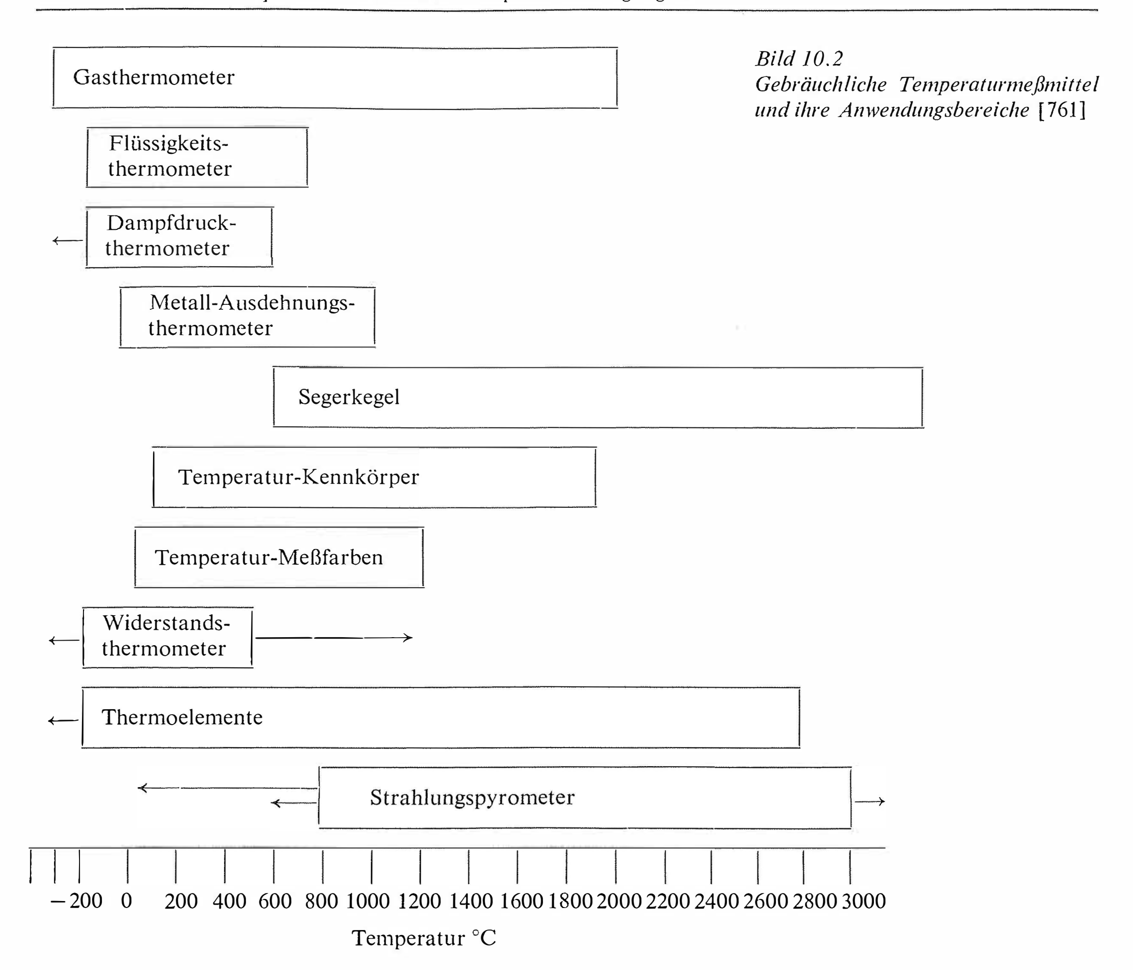


Bild 10.2
Gebräuchliche Temperaturmeßmittel und ihre Anwendungsbereiche [761]

element oder Thermopaar bezeichnet man eine Kombination zweier Materialien, die über zwei durch Lötung, Schweißung oder auch nur mechanischen Kontakt hergestellte Verbindungsstellen einen geschlossenen Leiterkreis bilden. Geeignete Werkstoffe sind in den Standards TGL 0–43 710 und TGL 0–43 712 [764] [765] mit ihren Materialkennwerten und Grundwertreihen der Thermospannung einschließlich der zulässigen Abweichungen zusammengefaßt. Daneben gibt es in großer Anzahl andere Elementtypen, für die gewisse Einschränkungen hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit im Dauerbetrieb existieren. Besonders hingewiesen werden soll auf Thermoelemente, die durch Kombination hochschmelzender Metalle entstehen. So gelingt es, im Vakuum oder in Schutzgassphäre Temperaturen bis 2800 °C thermoelektrisch zu messen (Elementtyp Wolfram/Wolfram-Rhenium).
Die Meßgenauigkeit erreicht bei Verwendung von Thermoelementen im allgemeinen nicht die mit Widerstandsthermometern erzielbaren hohen Werte. Die in [764] [765] angeführten, zulässigen Abweichungen gelten für die Serienfertigung von Thermoelementen; man kann durch Einzeleichung spezieller Elementexemplare die Grundwertreihen der Thermospannungen präziser und mit geringeren Abweichungen festlegen lassen.
Eine interessante Neuentwicklung sind *Mantelthermoelemente*. Sie haben ein dünnwandiges, metallisches Schutzrohr, das zwei oder vier isoliert geführte Thermodrähte enthält. Mantelthermoelemente sind biegsam und lassen sich weitgehend an vorliegende Meßprobleme anpassen.
Bei der thermoelektrischen Temperaturbestimmung stellt das Thermoelement nur den Meßfühler dar; von wesentlich größerem Umfang ist die Einrichtung zur *Temperaturanzeige*. Einzelheiten hierzu sind der Fachliteratur zu entnehmen [681] [698] [723] [761] [766].

10.1.1.2. Meßtechnische Probleme

Hat man eine aus mehreren Teilen zusammengesetzte Temperaturmeßeinrichtung, so interessiert deren Gesamtfehlergrenze, die sich aus den Fehlergrenzen ihrer Bestandteile errechnet [681] [687] [693] [761]. Dabei werden meist nur zufällige Meßfehler erfaßt, da man die nach Betrag und Richtung feststellbaren, systematischen Fehler, die sich durch die Meßanordnung (das System) ergeben und als eine Art individuelle, integrale Apparaturkonstante zu behandeln sind, schon bei der Ablesung berichtigen kann. Haben also die einzelnen Baugruppen einer Einrichtung für Thermometrie Fehlergrenzen $\pm f_1$, $\pm f_2$, ..., so ergibt sich nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz die *Gesamtfehlergrenze F* zu

$$F = \pm\sqrt{f_1^2 + f_2^2 + \dots} \qquad (10.1)$$

Hat z. B. ein Nickelchrom/Nickel-Thermoelement bei 100 °C eine zulässige Abweichung von ± 0,31 mV [764], so entspricht dies etwa ± 8 °C. Kombiniert man dieses Thermoelement mit einem direktanzeigenden Meßgerät der Klasse 0,5, so beträgt der auf den gesamten Meßbereich von 1200°C bezogene Fehler ± 0,5%, d. h. ± 6 °C. Die Gesamtfehlergrenze F der Meßeinrichtung beträgt dann

$$F = \pm\sqrt{8^2 + 6^2} = \pm 10°C.$$

Unterliegt die Vergleichsstellentemperatur starken Schwankungen, müßte man auch diese in die Rechnung einbeziehen.

Die Bestimmung der unvermeidbaren, systematischen Fehler einer Meßeinrichtung läßt sich sehr unterschiedlich durchführen. Man muß dabei von Prüfkörpern oder -substanzen ausgehen, an denen beim Erreichen einer bestimmten, bekannten Temperatur Änderungen sicher feststellbar sind. Dabei kann es sich um Umwandlungspunkte beliebiger Art handeln, z. B. Schmelz- oder Siedepunkte, Modifikationsänderungen oder Phasentransformationen. Aus dem Vergleich der an der Anzeigeeinrichtung abgelesenen mit der bekannten Temperatur findet man deren systematischen Anzeigefehler, der allerdings zunächst nur für Temperaturen nahe der zum Vergleich herangezogenen volle Gültigkeit hat. Verwendet man eine Reihe solcher Eich- oder *Testsubstanzen*, so gelingt es, den gesuchten systematischen Fehler in größeren Temperaturintervallen zu ermitteln. Sehr gebräuchlich für diesen Zweck sind neben einigen für die Reproduktion thermometrischer Festpunkte benutzten Stoffen reine, chemische Verbindungen und Gemische eutektischer Konzentration.

Für den Einbau und die Benutzung von Temperaturfühlern sind folgende, allgemeingültige Grundsätze zu beachten [761]:

a) Der Meßfühler darf das Temperaturfeld nur möglichst geringfügig durch Zu- oder Abfuhr thermischer Energie ändern.
b) Der Wärmeaustausch zwischen Meßfühler und Prüfgut muß durch entsprechende Anordnung möglichst günstig gestaltet werden.
c) Einen das Meßergebnis verfälschenden Wärmeaustausch des Temperaturfühlers mit anderen Körpern durch Wärmeleitung oder Strahlung muß man zu verhindern trachten.
d) Man muß den Prüfzustand der Temperaturanzeigeeinrichtung vor zerstörenden Einflüssen bewahren.

Es wird jedoch auch bei Beachtung aller Meßgrundsätze nicht gelingen, eine *Anzeigeverzögerung* des Temperaturmeßgeräts zu vermeiden. Die Ablesung des Meßwerts darf erst dann erfolgen, wenn sich die Anzeige dem wahren Wert bis auf einen vernachlässigbaren Bruchteil genähert hat. Nach TGL 0-1953 kann man diese Anzeigeträgheit mit den Begriffen der Zeitkonstante der Temperaturmeßeinrichtung und der Halbwertszeit erfassen. Die Angleichung der Temperatur des Meßfühlers an die des Meßguts erfolgt nach dem Newtonschen Abkühlungsgesetz exponentiell; ist die anfängliche Temperaturdifferenz ΔT_0, so hat sie sich nach der Zeit t auf ΔT verringert gemäß

$$\Delta T = \Delta T_0 \, e^{-t/\tau}. \qquad (10.2)$$

Die Zeit τ, in der die Temperaturdifferenz auf den 1/e-ten Betrag abgenommen hat, ist die sog. Zeitkonstante der Temperaturmeßeinrichtung. Daneben hat man als Halbwertszeit die Zeitdauer definiert, in der die Temperaturdifferenz auf die Hälfte des Anfangswerts abgenommen hat, d. h., $\Delta T = \Delta T_0/2$. Halbwertszeit H und Zeitkonstante τ sind durch folgende Gleichung verknüpft:

$$H = \tau \ln 2 = 0{,}693\tau. \qquad (10.3)$$

Für $\Delta T = 0{,}01\,\Delta T_0$, d. h. eine Annäherung der Anzeige bis auf 1% an den wahren Wert, ergibt sich aus Gl. (10.2)

$$0{,}01 = e^{-t/\tau} \quad \text{und daraus} \quad t \cong 4{,}6\tau \cong 6{,}7\,H.$$

Man muß also etwa die 7fache Halbwertszeit abwarten, um die 1%ige Annäherung an den wahren Meßwert zu erzielen. Bei der Wahl eines Tempe-

raturmeßmittels ist also dessen Anzeigeverzögerung zu beachten, um den dadurch verursachten Meßfehler klein zu halten. Zeitkonstante bzw. Halbwertszeit sind von der Anzeigeeinrichtung selbst sowie von der Einbauart des Meßfühlers abhängig; sie liegen in der Größenordnung Sekunden bis Minuten und lassen sich z. B. anhand einer bekannten Temperaturdifferenz ΔT_0 und Aufnahme des Verlaufs der zugehörigen Temperaturanzeige bei der betreffenden Meßanordnung genähert bestimmen.

10.1.2. Energieübertragung

In der Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie spielen Energietransportprobleme eine ausschlaggebende Rolle; und zwar handelt es sich einerseits darum, einem mikroskopischen Präparat thermische Energie – d.h. Wärmemengen – zuzuführen (Aufheizung, Hochtemperaturmikroskopie) oder sie ihm zu entziehen (Abkühlung, Tieftemperaturmikroskopie). Andererseits will man unerwünschten Energietransport verhindern oder zumindest eindämmen, weil man das mikroskopische Präparat nicht schlechthin erwärmen oder abkühlen möchte; es soll sich vielmehr in einem weitgehend homogenen Temperaturfeld befinden, damit sich reproduzierbare Resultate ergeben. Zur Erfassung der Energietransportprobleme bedarf es in diesem Fall zunächst noch der *Definition der Wärmemenge*, die neben der der Temperatur zur Charakterisierung des Wärmeinhalts eines Körpers wesentlich ist. Die Wärme ist eine Energieform, für sie gilt der Energieerhaltungssatz. Die bei Erwärmung oder Abkühlung eines Körpers ausgetauschte Wärmemenge ΔQ ist proportional der Temperaturdifferenz ΔT (die als Folge der Änderung des Wärmezustands ablesbar ist), der Masse m des Körpers sowie seinen stofflichen Eigenschaften, die man durch einen Faktor – die spezifische Wärme c – berücksichtigt. Es ergibt sich demnach folgender Zusammenhang:

$$\Delta Q = cm\Delta T. \qquad (10.4)$$

Das Produkt $C = cm$ bezeichnet man als Wärmekapazität. Gleichung (10.4) hat für hochtemperaturmikroskopische Untersuchungen zumeist keine entscheidende Bedeutung, da die Masse mikroskopischer Objekte stets gering ist und die zur Verfügung stehenden Wärmequellen gleichsam ein Überangebot an thermischer Energie zur Verfügung stellen. In der Tieftemperaturmikroskopie liegen die Verhältnisse u. U. anders, es wird darauf im Abschn. 10.1.2.2. hingewiesen.

Von größerem Einfluß auf die Arbeitsweise hoch- und tieftemperaturmikroskopischer Einrichtungen sind Fragen der *Wärmeleitung*, die man mathematisch mit der Wärmeleitungsgleichung erfaßt.

Die Durchrechnung realer Wärmeleitungsprobleme der hoch- und tieftemperaturmikroskopischen Praxis führt häufig unter sehr einschränkenden Bedingungen trotzdem noch zu unübersichtlichen Ergebnissen. Zudem ist der Energieübergang z.B. vom Heizelement zur Probe oft nicht an einen unmittelbaren Kontakt gebunden, sondern erfolgt über die Strahlung des Heizers, die im mikroskopischen Präparat absorbiert und in Wärme umgewandelt wird. Die Aufheizung ist dann ein Problem der Strahlungstheorie.

10.1.2.1. Verfahren zur Erhitzung mikroskopischer Objekte

Erste hochtemperaturmikroskopische Arbeiten wurden schon in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts durchgeführt. Man heizte das Präparat entweder direkt mit einer Gasflamme oder indirekt über metallische oder flüssige Zwischenmedien, die als Wärmeaustauscher wirkten.

Diese Energiequelle hatte erhebliche Nachteile, denn die Temperaturregelung über Ventile in den Leitungen war offensichtlich wenig feinfühlig; zudem dürfte die Wärmeströmung durch erhitzte Luft bzw. heiße Verbrennungsgase die Einstellung einigermaßen homogener Temperaturfelder erheblich behindert haben.

In den ersten Jahren des 20. Jahrhunderts fand man mit der *elektrischen Widerstandsheizung* einen neuen Weg zur Erhitzung mikroskopischer Präparate.

Man unterscheidet zwei Arten der Widerstandsheizung. *Direkte Widerstandsheizung* liegt dann vor, wenn die Probe selbst elektrisch bis zur gewünschten Temperatur erhitzt wird. Im Bild 10.3

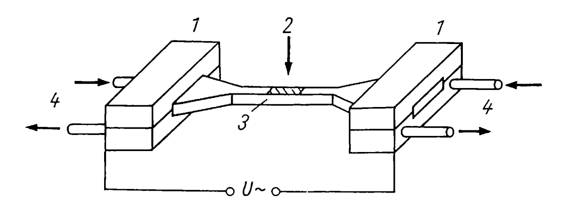


Bild 10.3. Probenanordnung bei direkter Widerstandsheizung (schematisch)

1 Elektroden; *2* Beobachtung; *3* Probe; *4* Elektrodenkühlung

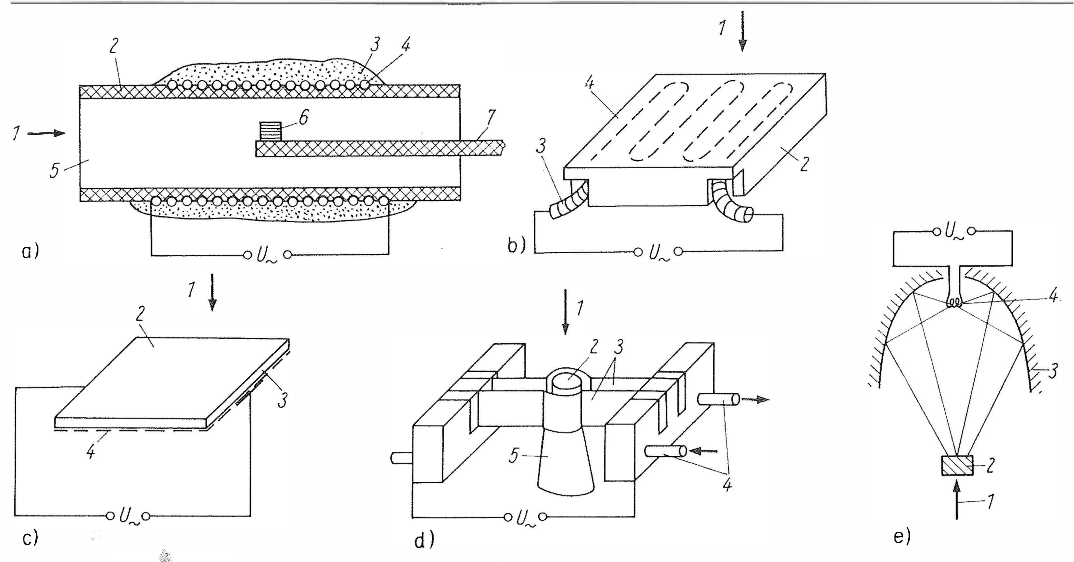


Bild 10.4. Verschiedene Varianten der indirekten Widerstandsheizung

a) *1* Beobachtung; *2* Keramikrohr; *3* Ausfütterung; *4* Heizspirale; *5* Ofenraum; *6* Probe; *7* Präparatträger
b) *1* Beobachtung; *2* Wärmeaustauscher; *3* Heizleiter; *4* Objektauflage
c) *1* Beobachtung; *2* Objektauflage; *3* Glasplatte; *4* aufgedampfte Widerstandsschicht
d) *1* Beobachtung; *2* Probe; *3* Heizbänder; *4* Kühlwasser; *5* Unterlage
e) *1* Beobachtung; *2* Probe; *3* Ellipsenspiegel; *4* Heizer

werden die Verhältnisse schematisch dargestellt. Damit sich die Elektroden *1* nicht unnötig erhitzen, werden sie von einem Kühlwasserstrom durchflossen. Der interessierende Bereich der Probe *3* ist im Bild 10.3 schraffiert gezeichnet. Bei direkter Widerstandsheizung muß die untersuchte Probe hinreichende elektrische Leitfähigkeit haben, und man muß Vorsorge treffen, daß die Längenausdehnung des Objekts bei Erhitzung von den Elektrodenhalterungen aufgefangen wird, damit keine mechanischen Spannungen entstehen.

Bei *indirekter Widerstandsheizung* werden keine solchen Forderungen an die Probe gestellt; im Bild 10.4 werden unter a) bis e) Beispiele für diese Heizart angegeben.

Die Energieübertragung erfolgt durch Wärmeleitung (direkter Kontakt, Wärmeaustauscher, Konvektion) oder Strahlung. Der Heizleiter kann aus Widerstandsdraht bestehen, den man zur Erzielung höherer Heizleistung zu einer Spirale wickelt, er kann aber auch eine Folie entsprechender Dicke sein; dieser Weg ist speziell zum Erreichen hoher Temperaturen gebräuchlich. Man arbeitet dann im Vakuum oder in geeigneter Gassphäre und setzt Metallbänder aus hochschmelzenden Werkstoffen ein. Für mittlere Temperaturen bis etwa 400°C kann man auch dünne Glasplatten mit transparenten, elektrisch leitenden Schichten bedampfen, die dann als Flächenheizer wirken. Eine interessante Art der Erhitzung mikroskopischer Präparate ist die unter Verwendung eines elliptischen Spiegels [742], in dessen einem Brennpunkt sich der möglichst punktförmige Heizleiter befindet, während die Probe im anderen Brennpunkt angeordnet ist.

Die Art des metallischen Heizleiters richtet sich nach dem Anwendungszweck. In [657] ist eine Übersicht über gebräuchliche Legierungen und reine Stoffe gegeben.

Zur Erwärmung von Präparaten auf Temperaturen, die nur wenig ober- oder unterhalb der der Umgebung liegen, kann man *Durchflußküvetten* verwenden.

Der Energieaustausch wird dabeidurch strömende Medien erreicht, die ein küvettenähnliches Teil durchfließen (Bild 10.5). In dessen Wandung sind

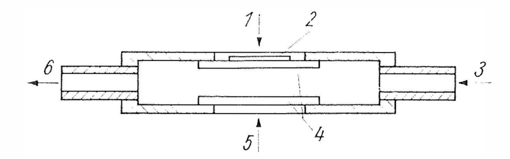


Bild 10.5. Schematische Darstellung einer Durchflußküvette

1 Beobachtung; *2* Präparat; *3* Zufluß; *4* Sichtfenster; *5* Beleuchtung; *6* Abfluß

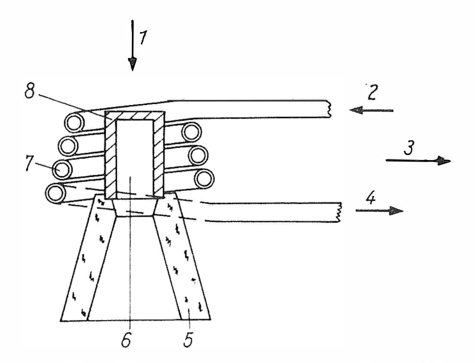


Bild 10.6. Probenanordnung bei induktiver Heizung (schematisch)

1 Beobachtung; *2* Kühlwasserzufluß; *3* HF-Generator; *4* Kühlwasserabfluß; *5* Probenhalterung; *6* Raum für Thermoelement; *7* Arbeitsspule; *8* Probe

Ausbrüche vorgesehen, die durch Glassichtfenster dicht verschlossen werden und der Beleuchtung und Beobachtung des Präparats dienen. Dieses wird auf das dem Mikroskopobjektiv nahe Sichtfenster aufgelegt. Als Heizmedien verwendet man geeignete Flüssigkeiten (Wasser, Methylalkohol, Glyzerin) oder erwärmtes Gas [675] [696].

Ebenfalls auf dem Prinzip der Widerstandsheizung der beobachteten Proben basiert die induktive Erhitzung metallisch leitender Präparate.

Grundlage hierfür ist die von *Faraday* entdeckte elektromagnetische Induktion. Ordnet man im Innern einer von hochfrequentem Wechselstrom durchflossenen Spule, in der ein mit gleicher Frequenz veränderliches magnetisches Feld existiert, eine zu erhitzende Probe (Bild 10.6) an, so treten in dieser sog. Wirbelströme auf, deren Stromstärke erheblich ist. Als Folge tritt Strom- oder Joulesche Wärme auf; die Probe wird erhitzt.

Ein weiteres Kennzeichen hochfrequenter Ströme und damit der induktiven Erhitzung ist der sog. *Skin- oder Hauteffekt.* Dieser besagt, daß die Dichte der in einem metallischen Festkörper induzierten Ströme an dessen Oberfläche am größten ist. Die Abnahme der Stromdichte nach dem Innern zu erfolgt exponentiell [715]. Mit steigender Frequenz konzentriert sich der Stromfluß mehr und mehr auf die oberflächennahen Gebiete des Leiters. Man muß dies durch entsprechende Gestaltung der die Hochfrequenz führenden Leitungen berücksichtigen. Aus diesem Sachverhalt könnte nun die Schlußfolgerung gezogen werden, daß dieses Aufheizverfahren für die Hochtemperaturmikroskopie ungeeignet sei. Dem ist nicht so, wie Versuche zeigen [739]; da sich die induktive Erhitzung ohnehin nur mit metallischen Leitern verwirklichen läßt, ist auch stets eine relativ hohe Wärmeleitfähigkeit garantiert, so daß sich mit dieser Methode hohe und höchste Temperaturen erzielen lassen.

Die erforderliche Hochfrequenzenergie kann man für Laboranwendungen mit geringen Einsatzmengen Röhrengeneratoren (Meißnergenerator, Colpittsgenerator) entnehmen, die sich leicht installieren, warten und regeln lassen.

Werkstoffe, die nur sehr geringe elektrische Leitfähigkeit haben, lassen sich nicht direkt induktiv erhitzen. Prinzipiell könnte man hier so vorgehen, daß man die im industriellen Maßstab verbreitet eingesetzte, *kapazitive Erwärmung* auf die Verhältnisse einer üblichen Hochtemperaturkammer anwendet. Es ist dem Verfasser bisher jedoch kein Fall dafür bekannt, daß man diese Heizart

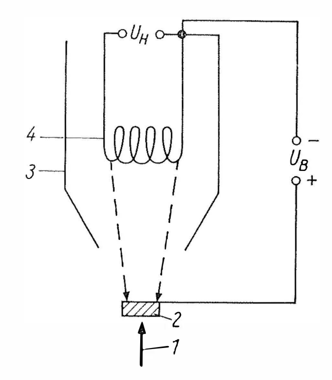


Bild 10.7. Aufheizung einer Probe mit Elektronenstrahlen (schematisch)

1 Beobachtung; *2* Probe; *3* Fokussierelektrode; *4* Katode

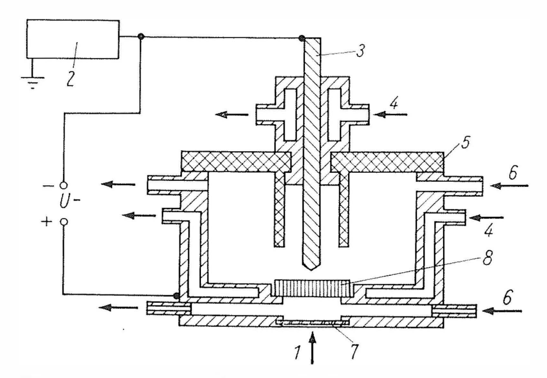


Bild 10.8. Lichtbogenheizung in einer Hochtemperaturkammer (schematisch) [660] [661]

1 Beobachtung; *2* HF-Zündung; *3* Wolframkatode; *4* Kühlwasser; *5* Isolierplatte; *6* Schutzgas; *7* Sichtfenster; *8* Probe

in hochtemperaturmikroskopischen Einrichtungen genutzt hat; man geht bei elektrisch nichtleitenden Proben in den meisten Fällen zur indirekten Erhitzung über.
Eine andere Art der Erhitzung hochtemperaturmikroskopischer Objekte ist die, bei der die Stoßenergie von Elementarteilchen in thermische Energie umgewandelt wird. Je nach der Höhe des Gasdrucks in der Hochtemperaturkammer unterscheidet man Elektronenstrahlen- oder Lichtbogenheizung (Bilder 10.7 und 10.8). In beiden Fällen ist die Probe selbst als Anode geschaltet oder mit dieser in Kontakt.

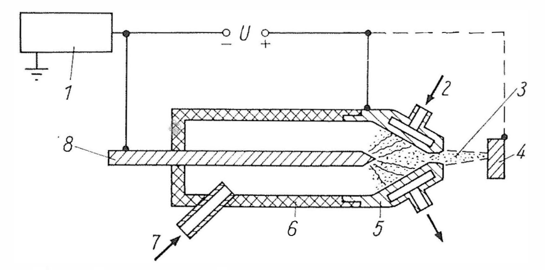


Bild 10.9. Schematische Darstellung eines Plasmabrenners

1 HF-Zündung; *2* Kühlwasser; *3* Plasmaflamme; *4* Probe; *5* Anode; *6* Isolierteil; *7* Bogengas; *8* Wolframkatode

Zur Abrundung des Kreises möglicher Heizmethoden ist noch die unter Benutzung der Energie eines Plasmas zu nennen, die etwa vom Prinzip des *Plasmabrenners* (Bild 10.9) ihren Ausgang nehmen könnte, bei dem das Plasma einer Hochstrom-Lichtbogenentladung flammenähnliche Form erhält, wenn man einen Schutzgasstrom im Entladungsraum durch eine wassergekühlte Düse blasen läßt.
Mit dieser Anordnung kann man ähnlich wie mit einem Schweißbrenner Metalle bearbeiten (Schweißen, Bohren, Trennen); selbst solche mit höchsten Schmelzpunkten, da Plasmaflammen Temperaturen von 10^4 °C und mehr entwickeln. Grundsätzlich ließe sich so ebenfalls die Erhitzung hochtemperaturmikroskopischer Proben – vornehmlich Stoffe mit hohem Schmelzpunkt – erreichen, allerdings ist bislang noch kein derartiges Hochtemperaturmikroskop bekannt geworden.
Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß man direkte Erhitzungsmethoden prinzipiell auch zur indirekten Heizung verwenden kann, indem man die ursprünglich direkt geheizte Probe als Träger und Heizelement für das dann indirekt geheizte Objekt benutzt.

10.1.2.2. Verfahren zur Abkühlung mikroskopischer Objekte

Zur Abkühlung mikroskopischer Präparate kann man grundsätzlich eine Durchflußküvette wie für Heizversuche (vgl. Bild 10.5) verwenden, man muß dann das strömende Medium auf die gewünschte Temperatur abkühlen. Unter Einbuße an Temperatureinstellgenauigkeit erreicht man das gleiche, wenn das Objekt in einem Kühltisch Kontakt mit einem Wärmeaustauscher hat, der mit Kühlmedien in direkter Verbindung steht.
Dies kann konstruktiv so gelöst sein, daß man entweder im oder um den Wärmeaustauscher eine Kühlkammer anordnet (vorwiegend für Durchlicht-Tieftemperaturmikroskopie, Bild 10.10 a), oder der massive Wärmeaustauscher bildet einerseits die Objektauflage, während er andererseits in ein Kühlmedium eintaucht (vorwiegend für Auflicht-Tieftemperaturmikroskopie, Bild 10.10b). Beide Gerätetypen sind möglich. Als gebräuchliches Kühlmedium findet entspanntes Kohlendioxid Verwendung. Damit erreicht man Temperaturen bis etwa – 60°C; geringere Werte sind mit flüssiger Luft oder anderen, verflüssigten Gasen (Wasserstoff, Helium) zu erzielen.
Zuweilen muß man bei Kühltischen dieser Art noch eine Heizeinrichtung vorsehen, mit der man in gewünschter Dosierung thermische Energie zuführen kann, die den Entzug von Wärme durch das Kühlmittel drosselt.

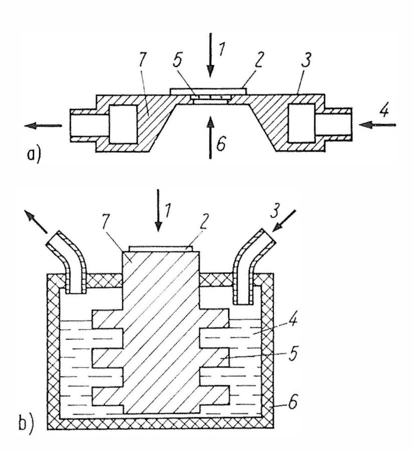


Bild 10.10. Anordnungen mikroskopischer Objekte zur Abkühlung mit Kältemitteln

a) *1* Beobachtung; *2* Probe; *3* Probenauflage; *4* Kühlmittelzufluß; *5* Sichtfenster; *6* Beleuchtung; *7* Wärmeaustauscher
b) *1* Beobachtung; *2* Probe; *3* Kühlmittelzufluß; *4* Kühlmittel; *5* Wärmeaustauscher; *6* Kühlmittelbehälter (wärmeisolierend); *7* Probenauflage

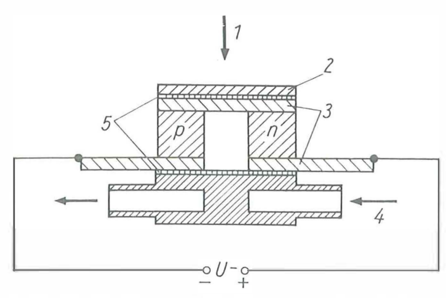


Bild 10.11. Probenabkühlung mit dem Peltier-Element (schematisch) [753]

1 Beobachtung; *2* Probenauflage; *3* Kupferbrücken; *4* Kühlwasser; *5* Isolationsschicht

In den letzten Jahren ist ein anderes Verfahren zur Kühlung mikroskopischer Präparate eingesetzt worden [702] [713], das auf dem von *Peltier* beschriebenen Effekt beruht. Schickt man durch eine geeignete Kombination zweier Werkstoffe, die über Kontakt-, Löt- oder Schweißstellen miteinander verbunden sind, Gleichstrom, so erwärmt sich eine Verbindungsstelle, während sich die zweite abkühlt. Bei Umkehrung der Stromrichtung kehrt sich auch der Effekt um, d. h., die vordem erwärmte Verbindungsstelle kühlt sich nun ab, die vorher gekühlte erwärmt sich. Im Verlauf der Entwicklung der Halbleitertechnik wurden Halbleiterwerkstoffe gefunden, bei denen der *Peltiereffekt* zu Temperaturdifferenzen von 60 bis 80 K zwischen den Verbindungsstellen führt. Man verwendet als Schenkelmaterialien der Anordnung je einen n- (Elektronen-) und p- (Defektelektronen-) Leiter und verbindet beide miteinander und mit der Stromquelle über massive Kupferbrücken (Bild 10.11), die als Objektauflage dienen können. Zur Erhöhung der Wirksamkeit einer Peltier-Anordnung kann man eine Reihenschaltung von Elementen aufbauen [669] [680] [753].

Dem Energiepumpvorgang arbeiten jedoch zwei bisher nicht genannte Effekte entgegen, die die Leistung der Kühleinrichtung begrenzen. Zum einen wird durch den Stromfluß Joulesche Wärme erzeugt (s. Abschn. 10.1.2.1.), zum anderen folgt aus dem 2. Hauptsatz der Wärmelehre das Streben zum Temperaturausgleich innerhalb der einzelnen n- und p-Leiter der Peltierbatterie über die Wärmeleitung. Durch entsprechende Dimensionierung der Peltierelemente und Wahl geeigneter Stromstärken erreicht man optimale Verhältnisse [669] [758].

Dieses Kühlverfahren bietet noch einen weiteren Vorteil. Es ist nämlich allein durch Umpolung des Gleichstroms möglich, den Kühltisch in einen Heiztisch umzuwandeln, und es läßt sich so ein Temperaturbereich von über 100 K (z. B. −20 bis +80°C) beherrschen. Die Temperaturkonstanz eines solchen Heiz- und Kühltisches ist nur von der Konstanz des Gleichstroms und in geringerem Maße von der des Kühlwasserstroms abhängig, da das energiepumpende Aggregat laufend in Betrieb ist und keine mit Anzeigeverzögerung verbundenen Schaltvorgänge auftreten.

10.1.3. Hoch- und tieftemperaturmikroskopische Einrichtungen

Für Untersuchungen an Präparaten aus Biologie und Medizin bei Temperaturen, die sich nur verhältnismäßig gering von der normalen Körpertemperatur des Menschen unterscheiden (etwa 37°C ± 10°C), verwendet man einfache *Temperiereinrichtungen.* Will man diese Präparate hingegen bei den in der Natur vorkommenden Temperaturen untersuchen, muß man *Heiz-* und *Kühltische mit erweitertem Temperaturbereich* einsetzen; als erforderliche Maximaltemperatur kann man dann etwa +60°C annehmen, weil in der Nähe dieses Werts die Eiweißdenaturierung den Zelltod herbeiführt. Andererseits ist die untere, wünschenswerte Grenze mit dem Schmelzpunkt des Eises oder noch etwas geringeren Temperaturen gegeben, weil dann die Lebensfähigkeit biologischer Objekte weitgehend verringert oder gar erloschen ist. Dies schließt selbstverständlich nicht aus, daß man in Einzelfällen noch extremere Temperaturen fordert.

Eine weitere Gruppe hoch- und tieftemperaturmikroskopischer Geräte – hier als *Heiz-* und *Kühlkammern* bezeichnet – gestattet die Untersuchung von Stoffen nach Methoden, die als thermomikroanalytische Verfahren in die Literatur eingegangen sind. Die mit derartigen Einrichtungen erzielbaren Temperaturen liegen zwischen −50 und +350°C, wobei diese Grenzen in manchen Fällen noch überschritten werden. Der Übertragung thermomikroanalytischer Verfahren auf Stoffe, bei denen Umwandlungspunkte bei noch höheren bzw. tieferen Temperaturen auftreten, dienen *Hoch-* und *Tieftemperaturkammern* für Durchlichtmikroskopie, bei denen die mit etwas größerem apparativem Aufwand erreichbaren Grenztemperaturen 1300 bis 1600°C bzw. −150 bis −180°C betragen.

Die Entwicklung der Metallurgie und Werkstoffkunde führte zu mikroskopischen Untersuchungs-

methoden, die man unter dem Begriff *Oberflächen-Hoch-* und *-Tieftemperaturmikroskopie* zusammenfassen kann. Es entstanden einerseits Hoch- und Tieftemperaturkammern zu handelsüblichen Metallmikroskopen (Maximaltemperaturen zwischen 1500 und 2000°C), zum anderen entsprechende Spezialgeräte mit hohem Leistungsvermögen (Spitzentemperaturen > 3000°C). Die untere Temperaturgrenze liegt in der Nähe des Siedepunkts von Stickstoff.

In der Übersicht im Bild 10.1 ist an letzter Stelle eine Gruppe mikroskopischer Geräte aufgeführt, mit denen bei sehr geringer Vergrößerung das Schmelz- oder Umwandlungsverhalten von Stoffen (z.B. feste Brennstoffe, keramische Rohstoffe und Gläser) untersucht wird. Der Temperaturbereich dieser Geräte, die in handelsüblichen Einrichtungen meist von horizontaler Bauart sind, reicht von Raumtemperatur bis 1800°C.

10.1.3.1. Temperiereinrichtungen – Heiz- und Kühltische

In diese Gerätegruppe fallen zwei Arten von Zusatzeinheiten für Mikroskope: einerseits Temperiereinrichtungen, mit denen man lediglich ein sehr schmales Temperaturintervall – vornehmlich beiderseits der Humantemperatur von +37°C gelegen – beherrscht, zum anderen Heiz- und Kühltische mit erweitertem Temperaturbereich, dessen Grenzen etwa bei −30 bis −20°C und +60 bis +80°C liegen.

Für Temperiereinrichtungen kennt man zwei Bauprinzipien. Entweder bringt man das gesamte Mikroskop in einen Wärmeschrank bzw. eine Klimakammer, deren Innentemperatur man reguliert, oder man versieht das Mikroskop mit einem Spezialtisch, der z.B. nach dem Durchflußprinzip (Bild 10.5) geheizt wird. Gleichwertig hierzu ist die elektrische Beheizung des Heiztisches (Bild 10.4, Varianten *b* und *c*).

Im Bild 10.12 ist ein handelsüblicher Wärmeschrank dargestellt [678].

Es findet ein für diesen Zweck besonders geeignetes Durchlichtmikroskop von umgekehrter Bauart Verwendung, wodurch die Mikroskopierleuchte außerhalb des aus transparentem Plast bestehenden Wärmeschranks liegt. Auch binokularer Einblicktubus und fotografische Einrichtung ragen aus dem Schrank heraus. Die Bedienelemente des Mikroskops sind über Drehstangen und -gelenke aus dem Wärmeschrank herausgeführt. Die Beheizung des Innenraums erfolgt mit Warmluft, die von einem Thermostaten zugeführt wird.

Temperiereinrichtungen dieser Art haben den Vorteil eines weitgehend konstanten Temperaturfelds in der Objektebene. Sie sind thermisch träger als entsprechende Heiztische, worauf besonders *Engel* und *Zerbst* [685] in einer Untersuchung hinweisen. Die mit Wärmeschränken erreichbaren Temperaturen dürften sich nicht wesentlich über +37°C steigern lassen, weil dann die Gefahr einer nachteiligen Beeinflussung der Abbildungsgüte der Optiksysteme besteht. Einschränkungen ergeben sich weiterhin dadurch, daß die Anwendung mikroskopischer Zusatzeinrichtungen – z.B. Mikromanipulatoren – in Wärmeschränken sehr erschwert ist.

Als Beispiele elektrisch betriebener *Mikroskopheiztische* seien hier die auf den Objekttisch handelsüblicher Mikroskope aufsetzbaren Typen SPERMOTHERM und BIOTHERM der Firma C. Reichert, Wien, erwähnt.

Während der in Zusammenarbeit mit *Kotler* und *Jahnel* [705] entstandene SPERMOTHERM

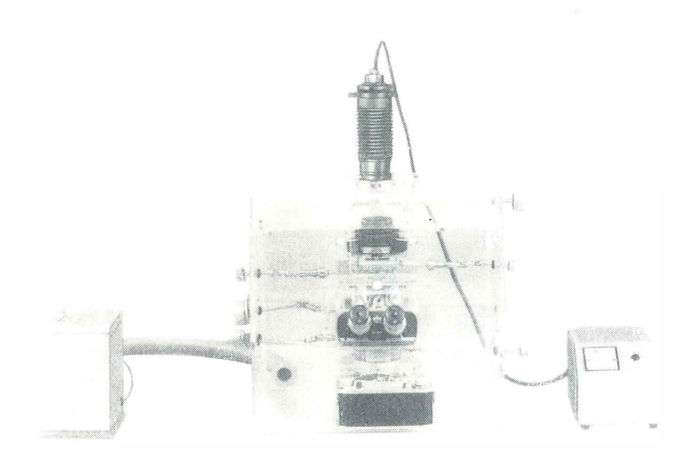


Bild 10.12. Wärmeschrank (Warming Chamber Equipment), Modell MWC, zum Mikroskop MiC-3Bi für bakteriologische und zytologische Untersuchungen bei +37°C

Union Optical Co., Ltd., Tokyo, Werkfoto

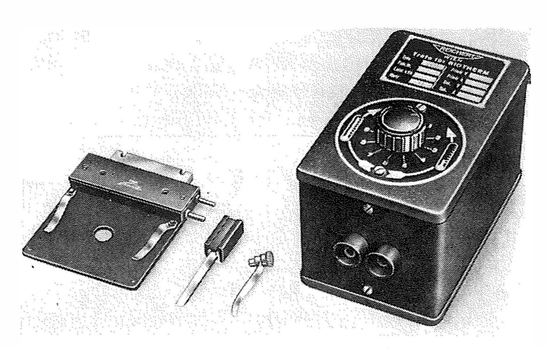


Bild 10.13. Biologische Heizplatte BIOTHERM mit Thermometer und Regeltransformator
Firma C. Reichert, Optische Werke, Wien, Werkfoto

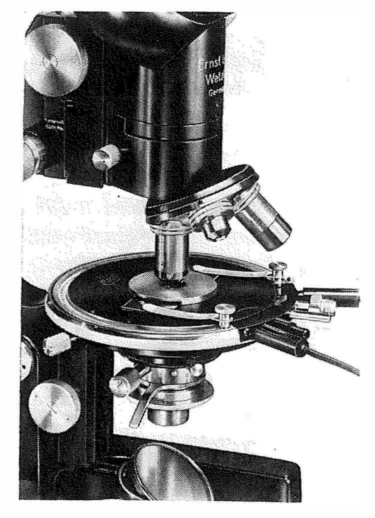


Bild 10.14. Heiz- und Kühltisch 80 nach Eisenberg mit automatischer Thermoregulierung
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

speziell für Spermauntersuchungen bei +37°C bestimmt ist, kann man mit dem unter Mitwirkung von *Stockinger* entwickelten BIOTHERM [676] Temperaturen von +35 bis 40°C erzielen. Im Bild 10.13 wird dieser Heizzusatz mit dem zugehörigen Berührungsthermometer, das mit einer Tischfeder auf den Objektträger geklemmt wird, und dem Regeltransformator gezeigt.
Gleichwertig nach dem Durchflußprinzip und mit elektrischer Heizung arbeitet ein von *Halle* und *Ristau* [695] [696] beschriebener Heiztisch. Um bei hoher mikroskopischer Vergrößerung die störende Wärmeableitung über das dann nahe dem Präparat liegende Mikroskopobjektiv zu vermindern, setzt man über dieses eine hohle, zylindrische Hülse, die ebenfalls beheizt wird und damit das Objektiv auf eine Temperatur bringt, die der des untersuchten Präparats nahekommt. Die Temperaturmessung erfolgt thermoelektrisch und in unmittelbarer Nähe des Objekts. Die Temperaturkonstanz des Heiztisches erreicht Werte von ± 0,2 °C und weniger. Die Einrichtung, die man bei entsprechender Betriebsweise des Thermostaten auch zur Objektkühlung verwenden kann, ist wie ein Objekttisch mit dem Mikroskop zu koppeln.
Während die bislang beschriebenen Wärmeschränke und Heiztische, die als Beispiele aus einer Vielzahl bekannt gewordener Konstruktionen herausgegriffen wurden, schon wegen der geringen Breite des Bereichs einstellbarer Arbeitstemperaturen fast ausschließlich für biologische und medizinische Untersuchungen benutzt werden, bieten *Heiz-* und *Kühltische mit erweitertem Temperaturbereich* zusätzlich eine Reihe ergänzender Anwendungsmöglichkeiten.

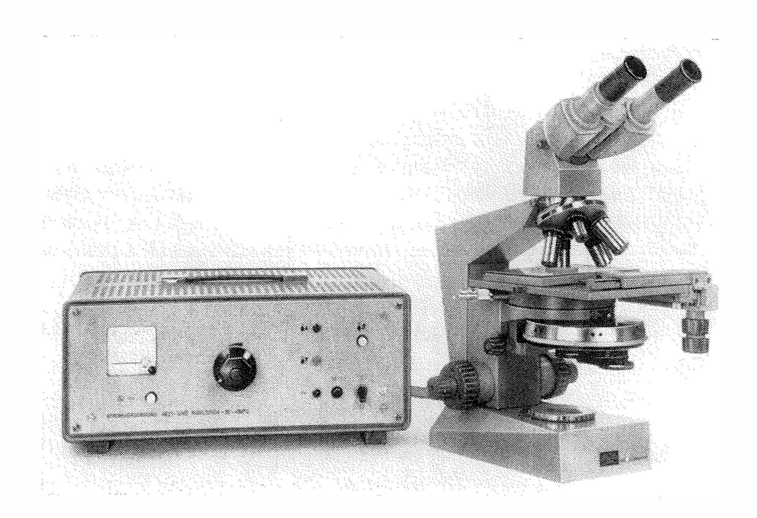


Bild 10.15. Heiz- und Kühltisch −20°C bis +80°C am Mikroskop ERGAVAL
VEB Carl Zeiss, JENA, Werkfoto

Als typische Vertreter dieser Gruppe von Zusatzeinheiten für Arbeits- und Forschungsmikroskope sind der Heiz- und Kühltisch 80 [672] der Firma E. Leitz, Wetzlar, und der Heiz- und Kühltisch −20 bis +80°C des VEB Carl Zeiss JENA anzusehen, auf die im folgenden kurz eingegangen wird.
Die häufig verwendete, indirekte Widerstandsheizung (Bild 10.4, Variante *b*) und die Kühlung mit Wasser bzw. Kohlendioxid (Bild 10.10 a) sind in dem auf Anregung von *Eisenberg* entwickelten Heiz- und Kühltisch 80 (Bild 10.14) [672] verwirklicht, dessen Grenztemperaturen −20 und +80°C betragen.
Er ist wie ein normaler Objekttisch an handelsübliche Mikroskope anbringbar und mit einem Bimetall-Thermoregulator ausgerüstet, der auf eine bestimmte Grenzstromstärke (entsprechend der gewünschten Objekttemperatur) eingestellt werden kann. Das zur Temperatureinstellung vorgesehene Glasthermometer ist längs des Umfangs in den Heiz- und Kühltisch eingelassen; für genauere Temperaturmessungen kann man ein Zusatzthermometer auf den Objektträger aufsetzen. Um das Präparat gegen Luftbewegungen abzuschirmen, kann eine Temperaturausgleichskammer aufgelegt werden, die man auf Bild 10.14 erkennt. Beim Kühlen wird sie von einer mit trockenem Stickstoff durchströmten Kammer ersetzt, die außerdem eine Betauung bzw. Bereifung des Objektträgers, Deckglases oder des Präparats selbst verhindert. Die Objektkühlung kann mit Wasser oder Kohlensäure vorgenommen werden.
Der Heiz- und Kühltisch −20 bis +80°C des VEB Carl Zeiss JENA [740] ist demgegenüber auf dem Prinzip der thermoelektrischen Heizung und Kühlung aufgebaut (Bild 10.11), wodurch die Umschaltung zwischen Heizung und Kühlung lediglich durch Betätigung eines Schalters ermöglicht wird.
Im Bild 10.15 ist die wie ein drehbarer Objekttisch aufgebaute Zusatzeinrichtung am Stativ ERGAVAL des VEB Carl Zeiss JENA dargestellt. Das Heiz- und Kühlelement bilden zehn in Ringform hintereinandergeschaltete Halbleiter-Peltierelemente, deren Kupferverbindungsbrücken den Energietransport vom und zum Objekt sowie zum wasserdurchflossenen Energieaustauscher vermitteln. Der Heiz- und Kühltisch ist mit einem Objektführer ausgerüstet, der eine Objektverschiebung von 20 mm × 20 mm erlaubt. In diesen läßt sich ein Meßobjektträger einsetzen, der ein in Präparatnähe eingekittetes Thermoelement enthält. Die Tischoberfläche kann mit einer Schutzhaube abgedeckt werden, die einerseits einen Temperaturausgleich im Innenraum bewirkt und andererseits beim Kühlen durch die Spülung mit trockenen Gasen das Betauen bzw. Bereifen des Präparats infolge Kondensation des in der Luft enthaltenen Wasserdampfs verhindert. Im Bild 10.15 ist außerdem das als Stromquelle für die Peltierbatterie dienende Vorschaltgerät erkennbar. Die Temperaturkonstanz ist im wesentlichen nur von der Konstanz der Netzeingangsspannung am Vorschaltgerät und in geringerem Maße von der des optimalen Wasserflusses durch den Energieaustauscher abhängig, da die Peltierbatterie im Dauerbetrieb arbeitet.
Bei den vorstehend beschriebenen Heiz- und Kühleinrichtungen ist man in hohem Maße darauf angewiesen, daß sich bei Verwendung der auch bei Raumtemperatur benutzten Optiksysteme andere mikroskopische Zusatzeinheiten – Feuchtkammer, Mikromanipulatoren, Polarisationszubehör, mikrofotografische und mikrokinematografische Einrichtung – einsetzen lassen. Auch die zum Rüstzeug des Mikroskopikers zählenden Beobachtungsverfahren (Dunkelfeld,

Einsatzgebiete für Temperiereinrichtungen sowie Heiz- und Kühltische für Untersuchungen in Biologie und Medizin
Temperaturverhalten mikroskopischer Objekte (lebende Objekte, tote Materie)
Lebenduntersuchungen engythermer Objekte (Gewebekulturen, Bakterien, Pilze, Protisten, Blut, Liquor, Aszites)
Spermauntersuchungen (Tierzucht)
Medizinische Mikrobiologie (Blut, Bakterien, Protisten)
Kältekonservierung toter und lebender Zellen
Brechzahlbestimmung nach der T- oder λ-T-Methode
Umwandlung des optischen Charakters (Spannungszustände, Modifikationsänderungen, Dehydratisierungsvorgänge)
Verfolgung von Lösungsvorgängen (Niederschläge, Peptisation)
Quellvorgänge an Fasern, Textilien, Leder
Aufklärung von Waschprozessen (Gewebe aus natürlichen und synthetischen Fasern)

Bild 10.16. Einsatzbereiche der im Abschn. 10.1.3.1. beschriebenen Heiz- und Kühleinrichtungen

Phasenkontrast, Interferenzkontrast, Polarisation, Fluoreszenz) sollten durchführbar sein. Diese Gesichtspunkte bestimmen den realen Wert einer solchen Zusatzeinrichtung.
Mit der im Bild 10.16 wiedergegebenen Übersicht werden die aus der Literatur bekannt gewordenen, wesentlichen Anwendungskomplexe der beschriebenen Heiz- und Kühltische systematisch zusammengefaßt. Der Einsatz der Temperiereinrichtungen und Heiztische mit schmalem, beiderseits der Humantemperatur von + 37°C gelegenem Temperaturbereich erstreckt sich fast ausnahmslos auf Untersuchungen an lebenden Objekten aller Art. Zusammenfassend ist festzustellen, daß es zur Gewinnung von Erkenntnissen über die Faktoren, die die Lebensfunktionen mehr oder weniger intensiv beeinflussen, unumgänglich ist, das Verhalten der individuellen Elementarbereiche pflanzlicher und tierischer Lebensformen unter Bedingungen zu beobachten, die ihre Lebensfähigkeit garantieren [757]. Dabei kann es sich um Zellen [756], Gewebekulturen (Explantate), lebensnotwendige oder krankheitserregende Bakterien, Pilze, niedere Organismen (Protisten) oder Körperflüssigkeiten (Blut, Liquor) handeln, die in vielen Fällen als engytherme (nur in einem sehr begrenzten Temperaturintervall beständige) Objekte anzusprechen sind. Von Interesse sind sowohl Probleme des gesunden als auch die des kranken oder sich krankhaft verändernden Individuums. Diese Fragen treten z.B. auch bei Organverpflanzungen auf. Von erheblicher Bedeutung sind Spermauntersuchungen [705], die bei der künstlichen Besamung in der Tierzucht die Grundlage einer erfolgreichen Anwendung des Verfahrens bilden.
Demgegenüber interessiert beim Einsatz von Heiz- und Kühltischen mit erweitertem Temperaturbereich in erster Linie die Abhängigkeit der Lebensfunktionen von der Temperatur. So wird die Erforschung der Lebensfähigkeit thermophiler (wärmebeständiger) bzw. psychrophiler (kältebeständiger) niederer Lebewesen in Abhängigkeit von der Umwelttemperatur ermöglicht. Die von den Normalwerten abweichenden Temperaturverhältnisse können die Lebensfunktionen infolge z. T. gegenläufiger Wirkungen stimulieren oder hemmen. Wachstumsvorgänge und Zellteilung sind häufig in unterschiedlicher Weise temperaturabhängig [757]. Die Kältekonservierung lebender und toter Zellen sind weitere Gegenstände dieser Studien.
Eine andere umfangreiche Gruppe von Untersuchungen unter Verwendung der Heiz- und Kühltische mit erweitertem Temperaturbereich betrifft die Bestimmung der Brechzahl durchsichtiger, fester Medien nach dem Immersionsverfahren [185]. Man kann entweder mit der Temperatur- oder der Doppelvariationsmethode arbeiten (s. Abschnitte 6.1.2. und 6.1.4.).
Bei anderen Untersuchungen mit Heiz- und Kühltischen der beschriebenen Art sind polarisationsoptische Hilfsmittel vonnöten, wenn man nämlich Änderungen des optischen Charakters des die mikroskopischen Objekte durchdringenden Lichts sicher feststellen will. So gelingt z. B. der Nachweis von Modifikationsänderungen (Polymorphie), Spannungszuständen und Dehydratisierungserscheinungen in Kristalliten. Zuweilen kann man diese Fragen auch ohne Untersuchung im polarisierten Licht klären, wenn nämlich bei Umwandlungen Änderungen der Dimensionen der kristallografischen Elementarzelle auftreten, wodurch der vordem klar durchsichtige Körper trübe wird, weil die beim Zerfall in kleine Bereiche erzeugten Spalte und Risse das Licht diffus streuen. Solche Phänomene können auch durch aus dem Kristallverband austretendes Kristallwasser hervorgerufen werden.
Der Temperaturbereich von Heiz- und Kühltischen dieser Art erlaubt außerdem die Beobachtung von Lösungsvorgängen an festen und kolloidalen Niederschlägen, die Untersuchung von Quellvorgängen an Fasern, Textilgeweben und Lederstoffen bei Behandlung mit Wasser oder anderen flüssigen Medien sowie die Aufklärung von Waschvorgängen.

10.1.3.2. Heiz- und Kühlkammern für mittlere Temperaturbereiche

[275] [575] [682] [712] [731]

Unter dem Begriff „Chemische Mikroskopie" versteht man die Anwendung mikroskopischer Untersuchungsverfahren auf die chemische Analysentechnik [575] [682] [712] [731]. Das Mikroskop bietet sich als Hilfsmittel für qualitative chemische Untersuchungen an, z. B. bei der Beobachtung von Niederschlägen oder Kristallwachstumserscheinungen. Entscheidende Impulse im Hinblick auf die Gewinnung quantitativer Aussagen empfing die chemische Mikroskopie durch einen Verfahrenskomplex, den man als *Thermo-Mikroanalyse* bezeichnet hat und dessen Entwicklung untrennbar mit den Namen *L.* und *A. Koflers* und denen ihrer Schüler verbunden ist [712]; weiterhin hat die Forschergruppe um *McCrone* in den USA entscheidende Beiträge hierzu geleistet [731].

Über erste Anwendungen von Heiz- und Kühleinrichtungen am Mikroskop wird schon in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts berichtet. Mit diesen gasbeheizten Objekttischen wurden vor allem Probleme der Kristallisation organischer und anorganischer Stoffe untersucht. Sehr bald ging man zur elektrischen Widerstandsheizung über (Bilder 10.4 b und c), die man auch heute noch in den meisten handelsüblichen und Versuchseinrichtungen anwendet [673] [759]. Der Temperaturbereich moderner Heiz- und Kühlkammern erstreckt sich von etwa −50 bis +350°C, zuweilen weichen die Grenzwerte etwas davon ab. Temperaturen unterhalb der der Umgebung erreicht man entweder mit besonderen Kühlkammern (Bild 10.10 a), die neben der Heizspirale angeordnet sind und im Kühlfall von entspanntem Kohlendioxid durchströmt werden, oder man benutzt neben dem Heiztisch noch einen besonderen Kühltisch, der auf die gleiche Art gekühlt wird. Eine Spezialeinrichtung für die Thermo-Mikroanalyse ist das in Zusammenarbeit mit dem Forscherehepaar *Kofler* entstandene Mikroskop THERMOPAN der Firma C. Reichert, Wien, mit Mikroheiz- und Mikrokühltisch [677].
Letzterer ist zusätzlich mit einer Heizspirale ausgestattet, wodurch Untersuchungen im Temperaturbereich zwischen −50 und +80°C ermöglicht werden. Zur Temperaturmessung dient ein Glasthermometer, und man beobachtet bei 100- oder 160facher Vergrößerung. Betauung bzw. Bereifung des Glasabschlußfensters und Objekts im Kühlfall durch kondensierten Wasserdampf wird dadurch unterbunden, daß man einen Teil des zur Abkühlung benutzten, trockenen Kohlendioxids durch die Präparatkammer leitet. Das gleiche bewirkt eine auf das Objektiv gesteckte Schwammgummihülse an der Außenseite des Glassichtfensters. Man kann außer im Hellfeld auch im polarisierten Licht und im Phasenkontrast beobachten, und an das Mikroskop lassen sich eine mikrofotografische Einrichtung, verschiedene Leuchten und ein Mikroprojektionszusatz anbringen. Zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten bietet ein zum Mikroheiztisch (Temperaturbereich +30 bis 350°C) verfügbarer Vakuumsublimationsblock nach *Kofler*.
Bemerkenswert im Hinblick auf die Dokumentation der Versuchsergebnisse ist der Mikroskopheiztisch 350 von E. Leitz, Wetzlar (Bild 10.17), mit dem Temperaturen zwischen −20 und +350°C erzielt werden können [673].
Auch er basiert auf dem Prinzip der indirekten Widerstandsheizung und hat eine eingebaute Kühlkammer für Versuche unterhalb Raumtemperatur. Ein besonderes Heiztischstativ vervollständigt die Einrichtung, und man erreicht so eine maximale Vergrößerung von 200×, wobei Beobachtungen im Hellfeld und mit polarisiertem Licht möglich sind. Zur Temperaturmessung dient ebenfalls ein Glasthermometer, dessen Anzeige über eine am Heiztischokular angeordnete Schiebeprismenvorrichtung in das Bildfeld eingespiegelt wird. Damit ist bei fotografischen Aufnahmen neben dem Objekt auch die jeweils angezeigte Temperatur registrierbar.
Einen ähnlichen Aufbau wie das soeben beschriebene Gerät hat auch das Spezialmikroskop mit Mikroheiztisch BOETIUS des VEB Analytik, Dresden [670].

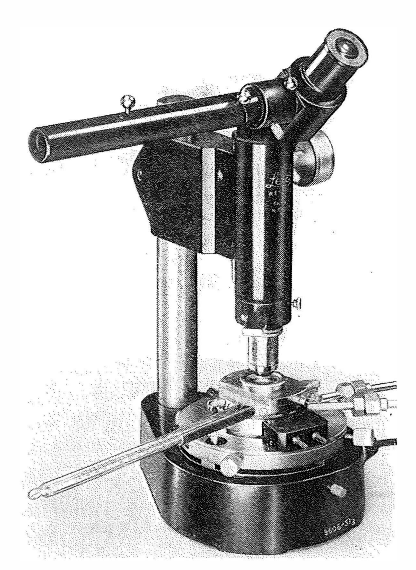


Bild 10.17. Mikroskopheiztisch 350 mit Heiztischstativ und Einrichtung für direkte Temperaturablesung im Okular
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

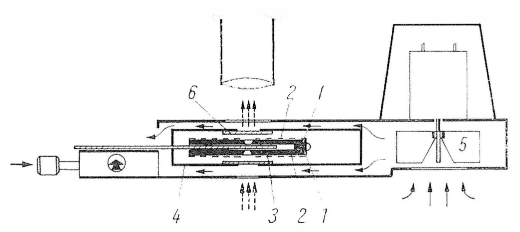


Bild 10.18. Heiztischmodell FP 2 (Querschnitt, schematisch)
1 Metallplatte; *2* Heizleiter; *3* Temperaturfühler; *4* Innengehäuse; *5* Ventilator; *6* Wärmeschutzfilter
Firma Mettler, Greifensee-Zürich

Eine interessante Entwicklung stellt das Heiztischmodell FP 2 der Firma Mettler, Greifensee-Zürich, dar (Bild 10.18) [759] [769].
Diese Heizkammer hat nicht die übliche Dosen- oder Zylinderform; sie ist rechteckig gestaltet mit aufklappbarem Deckelteil. Das Probenmaterial wird von oben und unten geheizt, wodurch man ein gleichmäßiges Temperaturfeld erhält. Um die Wärmeübertragung auf das Mikroskop zu vermindern, wird durch die Hohlräume des doppelwandig ausgeführten Gehäuses mit einem eingebauten Kleinventilator Kühlluft geblasen. Neuartig ist die elektronische Aufheizautomatik der Heizkammer. Man kann mit drei Temperatur-Anstiegsgeschwindigkeiten (10 K/min; 2 K/min; 0,2 K/min) erhitzen, aber auch isotherme Stufen nach Wunsch einschalten. Eine weitere bemerkenswerte Lösung stellt die Temperaturanzeige mit Platin-Widerstandsthermometer und digitaler Anzeige dar, wobei zusätzlich noch drei beliebige Temperaturwerte gespeichert werden können. Die Ablesung ist auf 0,1 K möglich, die Genauigkeit erreicht maximal $\pm 0,1$ K. Der nutzbare Temperaturbereich erstreckt sich von Raumtemperatur bis 300°C.
Um das Schmelz- und Erstarrungsverhalten von Substanzen beobachten zu können, entwickelten *Hunt*, *Jackson* und *Brown* [703] einen Temperaturgradienten-Heiztisch für Mikroskope.
Neben den hier beschriebenen z.T. handelsüblichen Heiz- und Kühlkammern für Mikroskope sind aus der Literatur noch eine Vielzahl weiterer Konstruktionen bekannt [712] [743].
Die mikroskopische Ausrüstung der genannten Heiz- und Kühlkammern für mittlere Temperaturen ist im allgemeinen etwas weniger umfangreich als die der im letzten Abschnitt besprochenen Heiz- und Kühltische. Vor allem ist man in geringerem Maße an hohen Vergrößerungen interessiert; 100 × bis 200× ist die in den meisten Fällen ausreichende obere Grenze. Bei Durchlichtbeleuchtung ist das Arbeiten im polarisierten Licht und mit Phasenkontrast wesentlich. Es sind aber auch Fälle bekannt geworden, wo man im Dunkelfeld und mit Fluoreszenzlichtbeobachtung wertvolle Resultate erhielt. Dabei muß man wegen der Bauhöhe der Heiz- und Kühlkammern zur Verwirklichung all dieser Forderungen zumeist auf Spezialkondensoren mit großer Schnittweite zurückgreifen, während man bei den benutzten Objektiven, die an sich schon ausreichende freie Arbeitsabstände haben, seltener auf Spezialsysteme angewiesen ist. Erwähnenswert ist noch, daß man oft auch Auflicht- oder kombinierte Durchlicht-Auflicht-Beleuchtung einsetzt.

Anwendungsgebiete der Heiz- und Kühlkammern für mittlere Bereiche
Bestimmung des Temperatur-, Schmelz- und Erstarrungsverhaltens (Reinheitsprüfung, Polymorphie, Identitätsuntersuchung, Kristallisation, Zersetzung)
Untersuchung von Zustandsdiagrammen (Thermo-Mikroanalyse)
Umwandlung des optischen Charakters (Verfärbung, Modifikationsänderungen, Dehydratisierungsprozesse)
Mikro-Sublimation (Vakuumsublimation) und Mikro-Siedepunktbestimmung
Lichtbrechungsbestimmung an Schmelzen
Beobachtung chemischer Reaktionen unter dem Mikroskop
Bestimmung des Molekulargewichts (Methode nach Rast)
Thermo-Mikroanalyse von Fasern und Kunststoffen

Bild 10.19. Einsatzbereiche der im Abschn. 10.1.3.2. beschriebenen Heiz- und Kühlkammern

Im Bild 10.19 sind die wesentlichen Einsatzbereiche der Heiz- und Kühlkammern für mittlere Temperaturen zusammengefaßt. An erster Stelle stehen Untersuchungen des Schmelzverhaltens vorwiegend organischer Substanzen, aus denen man Schlüsse auf deren Reinheit, das Kristallisationsverhalten, die Form von Zustandsdiagrammen zwischen zwei oder mehreren Komponenten oder die Identität zu prüfender Stoffe mit bekannten ziehen kann [575] [712] [731]. Dabei ist es empfehlenswert, die Schmelztemperatur durch das Gleichgewicht zwischen Schmelze und den letzten, ungeschmolzenen Kristallresten festzulegen, um Fehlresultate durch Unterkühlungserscheinungen beim Abkühlen nach dem völligen Durchschmelzen der Probe zu vermeiden. Man überfährt die Schmelztemperatur stets mehrfach in beiden Richtungen mit Temperaturänderungsgeschwindigkeiten $\leqq$ 4 K/min (*Kofler*). Zersetzt sich eine Substanz beim Schmelzen, so bleibt die Gleichgewichtstemperatur nicht konstant.
Die Reinheit von Substanzen kann man oft schon aus dem Schmelzverhalten beurteilen; denn Verunreinigungen äußern sich durch vorzeitiges Schmelzen einzelner Partikel. Dazu genügen u.U. schon Beimengungen unter 1%. Verunreinigungen anorganischer Natur haben vielfach

einen höheren Schmelzpunkt als die organische Grundsubstanz und bleiben nach deren Schmelzen als ungeschmolzene Reste zurück. Zur Reinheitsbestimmung und Identifizierung von Stoffen zieht man häufig auch die *eutektische Temperatur* beim Mischen mit bekannten, geeigneten Substanzen heran. Bei binären Gemengen verhalten sich Eutektika wie reine Stoffe; und die eutektische Temperatur kennzeichnet bei anderen Zusammensetzungen als der eutektischen den Beginn des Schmelzbereichs. Bei der Identitätsprüfung vergleicht man das Verhalten der unbekannten Substanz beim Erhitzen und Abkühlen mit dem einer bekannten [712].

Vielfach wird die Bestimmung des Schmelzverhaltens durch *Sublimationsvorgänge* gestört [712]. Man kann die Temperatur des Beginns stärkerer Sublimation als Sublimationstemperatur definieren.

Unter Benutzung besonderer Hilfsmittel (Kapillaren) gelingt es, *Siedetemperaturen* von Substanzen mit Heizkammern zu bestimmen. Ebenso muß man das Schmelzverhalten leicht flüchtiger oder sich an Luft zersetzender Stoffe mit Hilfe zugeschmolzener Kapillaren ermitteln, die man eventuell noch mit indifferentem Gas füllt (Mikroküvette nach *Fischer*) [712].

Als *Polymorphie* bezeichnet man die Eigenschaft chemischer Verbindungen, zwei oder mehrere, sich durch unterschiedliches Kristallisationsverhalten auszeichnende Zustandsformen (Modifikationen) zu bilden, die auch voneinander abweichende physikalische Eigenschaften (z.B. Schmelztemperaturen) haben [712]. Umwandlungen des optischen Charakters äußern sich oft in einer Verfärbung der betrachteten Kristalle. Sie ist z.B. zu beobachten, wenn Kristallwasser aus Hydraten entweicht. *Dehydratisierungsprozesse* lassen sich auch im polarisierten Licht gut verfolgen. Feingepulverte Präparate bettet man in Paraffinöl ein und erkennt dann das Entweichen des Kristallwassers am Aufschäumen der Probe [712].

Breiten Raum in der Anwendung von Heiz- und Kühlkammern nimmt die *Untersuchung von Zustandsdiagrammen* ein, die man im engeren Sinne als Thermo-Mikroanalyse bezeichnen kann [712] [731].

Eine Vorzugsstellung bei diesen analytischen Arbeiten genießt die Kontaktmethode, bei der die Mischzone sich berührender Stoffe beim Erwärmen und Abkühlen mikroskopisch beobachtet wird.

Zum *Bestimmen der Brechzahl* geschmolzener Substanzen ist das Immersionsverfahren geeignet (s. Abschn. 10.1.3.1.). Allerdings geht man hier von Glaspulvern mit bekannten Brechzahlen aus, die man in die Schmelze bringt [677] [712]. Heiz- und Kühlkammern der vorgegebenen Art bieten sich weiterhin für das Studium chemischer Reaktionen an, wobei man die Geschwindigkeit des Prozeßablaufs durch geeignete Temperaturwahl beeinflussen kann; ferner zur *Bestimmung der Molekularmasse* chemischer Verbindungen. *Kofler* und *Brandstaetter* benutzten hierfür die Methode nach *Rast*, die von der Erniedrigung des Schmelzpunkts bei Zumischung eines unbekannten Stoffs zu einem geeigneten, ausgewählten ausgeht [712].

Zum Abschluß dieser Betrachtung soll noch auf zwei Verfahren hingewiesen werden, die die Beobachtung thermooptischer Effekte sowie Schmelzpunktbestimmungen an Chemiefaser- und Kunststoffen enthalten. Im ersten Fall ist es erforderlich, polarisationsoptische Mittel einzusetzen, um z.B. das Umschlagen der Doppelbrechung in Kunstfasern zu erkennen [691]. Die Schmelzpunktbestimmung an *Chemiefaserstoffen* wird von *Jörg* [709] als eine Ergänzung zur normalen *Faseranalyse* betrachtet, die bestimmte Ausscheidungsmerkmale zu liefern vermag.

10.1.3.3. Hoch- und Tieftemperaturkammern

Es ist naheliegend, die im letzten Abschnitt besprochenen Untersuchungsmethoden auf Temperaturbereiche auszudehnen, die sich einerseits bis nahe an den absoluten Nullpunkt, andererseits bis zu Werten um 1600°C und höher erstrecken. Bei der Konstruktion entsprechender Heiz- und Kühleinrichtungen muß man einige neue Aspekte berücksichtigen. Im Gegensatz zu gleichartigen Geräten für die Oberflächen-Hoch- und -Tieftemperaturmikroskopie gestatten sie jedoch das Arbeiten in Durchlicht- und Auflichtbeleuchtung (bzw. der Kombination beider).

Der Heizvorgang in Hochtemperaturkammern basiert auf dem Prinzip der indirekten Widerstandsheizung (Bild 10.4 a). Um den Einfluß des Luftsauerstoffs auf ablaufende Prozesse zu verhindern, wird Schutzgassphäre angewendet. Vielfach sieht man eine Wasserdurchflußkühlung der Kammerwandungen und der Teile vor, die nahe der Mikroskopoptik liegen, um Schäden durch thermische Einwirkung vorzubeugen. Des weiteren trifft man häufig Maßnahmen, um Störungen in der Beobachtung von Vorgängen durch die Kondensation von Substanzen, die aus der Probe abdampfen, mit einer entsprechenden Vorrich-

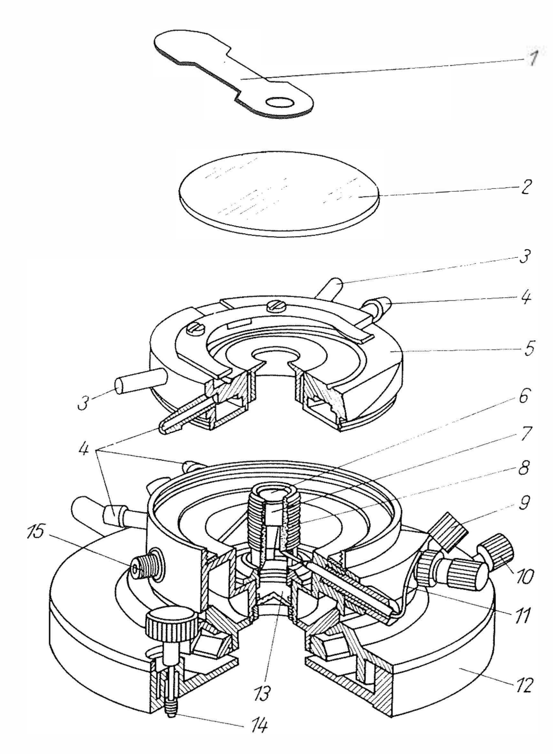


Bild 10.20. Mikroskopheiztisch 1350

1 Strahlungsschutz; *2* drehbares Sichtfenster; *3* Schutzgasanschluß; *4* Kühlwasseranschluß; *5* Deckelteil; *6* Objektträger; *7* Metallauflage mit Thermoelement; *8* Heizkörper; *9* Rändelschraube zur Objektausrichtung; *10* Rändelschraube zur Objektorientierung; *11* Thermoelement; *12* Unterteil; *13* Quarzfenster; *14* Befestigungsschraube; *15* Stromzuführung

Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

tung zu umgehen. Zur Temperaturmessung benutzt man fast ausschließlich Thermoelemente. Die Mikroskopausrüstung enthält stets Spezialobjektive und Kondensoren mit großer Schnittweite. Im Durchlicht muß das Arbeiten im polarisierten Licht möglich sein. Sehr erwünscht ist außerdem der Einsatz von Phasenkontrasteinrichtungen. Dunkelfeld wird aufgrund der großen Schnittweite der Optiksysteme seltener verwendet, obwohl dieses Beobachtungsverfahren überaus interessante Informationen zu liefern vermag. Ein Vertreter dieser Gerätegruppe ist der Mikroskopheiztisch 1350 von E. Leitz, Wetzlar (Bild 10.20) [674].

Die Hochtemperaturkammer hat Vorrichtungen zum Orientieren und Ausrichten der Objekte parallel zur Tischoberfläche. Der mit Schutzgas spülbare Heizraum ist durch Sichtfenster aus geschmolzenem Quarz verschlossen; das dem Objektiv zugewandte ist exzentrisch und drehbar gelagert. Damit kann man – sobald die der Durchsicht zur Probe dienende Stelle durch Bedampfung undurchlässig geworden ist – einen unbedampften Teil desselben in den Strahlengang bringen. Als Objektträger dienen Saphirplättchen (Durchlicht) oder Sinterkorundträger (Auflicht), die auf eine metallische Unterlage gelegt werden, an die auch das Thermoelement angeschweißt ist. Um systematische Fehler der Temperaturanzeige zu eliminieren, empfiehlt der Hersteller die Eichung mit geeigneten, chemisch reinen Stoffen, deren Schmelzpunkt bekannt ist. Die Aufheizgeschwindigkeit beträgt im Normalfall 4 bis 6 K/min; nach [717] wird sogar ein Wert ≤ 2 K/min angeraten. Die optische Ausrüstung ist so gewählt, daß 90× und 600× die Grenzen der förderlichen Vergrößerung sind. Der Temperaturbereich erstreckt sich von Raumtemperatur bis 1350 °C.

Über die Konstruktion einer bis 2000 °C benutzbaren Heizeinrichtung referierte *Dodd* [668].

Man biegt eine Schleife aus Widerstandsdraht, die gleichzeitig die Funktionen des Heizelements, Probenträgers und Widerstandsthermometers hat. Das gleiche Prinzip – jedoch unter Einsatz von Thermoelementen – verwendete *Welch* in einer Heizzelle. Ausgehend davon kombinierten *Glaser*, *Mercer*, *Miller* und *Sommer* [732] die Hochtemperaturmikroskopie mit der Differentialthermoanalyse und ordneten in der Heizzelle zwei Thermoelemente an. Das eine trägt die zu analysierende Substanz (≈ 1 mg!), das zweite das Vergleichsmaterial.

Zu Untersuchungen in Glas (Devitrifikation) benutzte *Brock* [659] eine Heizvorrichtung aus zwei Platinfolien mit 0,5 mm Dicke, zwischen die die auf einem Platinobjektträger befindliche Probe geschoben wird. Beobachtung und Beleuchtung erfolgen durch Öffnungen in den Heizfolien und im Objektträger. *Brock* verwandte 70fache Vergrößerung (Steigerung auf 200× wird als möglich angesehen) und registrierte das Kristallwachstum im Glas. Mit der auf den Objekttisch eines petrografischen Mikroskops aufgesetzten Heizvorrichtung erreicht man eine Maximaltemperatur von 1050 °C.

Die beschriebene Möglichkeit der Vereinigung von Heiz- und Kühlkammern ist bei den Hoch- und Tieftemperaturkammern überhaupt nicht oder nur für einen sehr begrenzten Temperaturbereich gegeben.

Kröger beschreibt eine nach dem im Bild 10.10 a gezeigten Prinzip arbeitende *Tieftemperatur-*

kammer für Temperaturen bis −120°C [716]. Zwei der wiedergegebenen Einheiten sind so miteinander gekoppelt, daß man zwischen beide das Objekt einschieben kann. Als Kältemittel dient flüssige Luft. Zur schnellen Erwärmung der Objekte nach dem Abkühlen ist eine Heizwicklung vorgesehen.
Kühlkammern, mit denen man Objekte bis zur Siedetemperatur des Stickstoffs abkühlen möchte, müssen nach dem im Bild 10.10 b angedeuteten Prinzip aufgebaut sein. Eine solche Tieftemperaturkammer beschreibt *Clothier* [663]. Man benutzt eine in L-Form gebogene, rechteckige Aluminiumstange, deren kurzer Schenkel als Objektträger dient. Bei Durchlichtbeleuchtung verwendet man zwei in der Al-Stange angeordnete Linsen als Kondensor. Die erreichbare Mindesttemperatur betrug −185°C, die höchste erzielbare Vergrößerung 600×.
In einer von *Gobrecht*, *Nelkowski* und *Schlegelmilch* [690] beschriebenen Tieftemperaturkammer für Temperaturen zwischen 4 und 500 K (d.h. auch für Erwärmung bis etwa 230°C) gelangt das Kältemittel in das hohle Innere des als Objektträger dienenden zylindrischen Teils. Um die Bereifung des Präparats und der im Strahlengang liegenden optischen Bauelemente zu umgehen, wird der Objektraum, in den das Mikroskop hineintaucht, evakuiert. Das Mikroskop befindet sich also z.T. im Hochvakuum. Schärfeeinstellung sowie axiale und radiale Verschiebung bewirkt man durch mechanische Bauelemente, wobei ein Metallfederbalgen die erforderliche Beweglichkeit gewährleistet. Zur Temperaturmessung wird – wie in allen hier erwähnten Konstruktionen – ein Thermoelement eingesetzt (Typ Konstantan/Manganin).
Im Bild 10.21 sind die wesentlichen Arbeitsgebiete zusammengestellt, für die Hoch- und Tieftemperaturkammern benutzbar sind. Die *Bestimmung des Schmelz-* und *Erstarrungsverhaltens* führt man weitgehend analog zu den Verfahren durch, die von *L.* und *A. Kofler* [712] u.a. für organische Substanzen beschrieben wurden. Über einige Erfahrungen auf diesem Sektor wird z.B. von *Kuhnert-Brandstaetter* und *Müller* berichtet [717]. Erwähnenswert ist, daß Unterkühlungseffekte bei anorganischen Schmelzen eine geringere Rolle spielen als bei organischen. Zur Untersuchung von Zustandsdiagrammen und Phänomenen, die bei Gefüge- und Modifikationsänderungen auftreten, sind an dieser Stelle keine weitergehenden Ausführungen zu machen. Untersuchungen, die Erscheinungen bei der Glasherstellung und im

Einsatzbereiche der Hoch- und Tieftemperaturkammern
Bestimmung des Temperatur-, Schmelz- und Erstarrungsverhaltens (Reinheitsbestimmung, Identifizierung, Identitätsvergleich, Sublimation)
Feststellung von Gefüge- und Modifikationsänderungen
Untersuchung von Zustandsdiagrammen
Untersuchung schmelzender Glasgemenge (Schmelz- und Lösungserscheinungen, Verunreinigungen, Fremdkörper, Gasausscheidungen)
Untersuchung von Entglasungserscheinungen und Umlagerungsvorgängen im Glasgerüst im Transformationsbereich
Bestimmung der Homogenisierungstemperatur von Einschlüssen
Veraschung biologischer Objekte
Gefriertrocknung und Gefrierätzung biologischer Objekte

Bild 10.21. Einsatzbereiche der im Abschn. 10.1.3.3. beschriebenen Hoch- und Tieftemperaturkammern

Glas selbst enthalten, sind ein für Hochtemperaturkammern spezifisches Gebiet. Dabei kann es sich um *Entglasungserscheinungen* (Devitrifikation) handeln oder um die mikroskopische Beobachtung des Erweichungs- und Schmelzvorgangs mit seinen Nebenerscheinungen (Lösungsprozesse, Wirkung von Fremdkörpern und Verunreinigungen, Auftreten von Gasausscheidungen, Umwandlung der Glasstruktur) [659]. An Einschlüssen in natürlichen Mineralien lassen sich mit Hilfe von Hoch- und Tieftemperaturkammern *mineralgenetische Studien* durchführen. Man beobachtet den Vorgang der Homogenisierung des Einschlußinhalts beim Erhitzen und die Trennung der Phasen beim Abkühlen. Die Homogenisierungstemperatur ist neben den Ergebnissen der chemischen Mikroanalyse von Interesse; die gewonnenen Erkenntnisse verwertet man u.a. bei der industriellen Kristallzucht.
Auf zwei weitere Anwendungsgebiete sei abschließend noch hingewiesen, die bei exakter Betrachtung zu den biologischen Untersuchungsmethoden zu rechnen sind. Will man die Verteilung mineralischer Bestandteile in Gewebeschnitten, Ausstrichen oder Totalpräparaten kennenlernen, so erhitzt man diese auf 500 bis 550°C und bringt so die organische Substanz zum Verdampfen. Die zurückbleibenden, anorgani-

schen Komponenten bilden das sog. *Spodogramm*, das man im Phasenkontrast, Durchlicht-Dunkelfeld oder im Auflicht betrachtet. Das zweite Verfahren betrifft die in der Histo- und Zytochemie gebräuchliche *Gefriertrocknung* und *-ätzung*. Dabei wird, um die Verteilung bestimmter Bestandteile des Objekts zu fixieren, dieses im Hochvakuum auf tiefe Temperaturen gebracht, so daß das enthaltene Wasser schnell erstarrt und das Eis sublimiert. Die Probe trocknet dadurch aus; u. U. wird so ihre Struktur erkennbar.

10.1.3.4. Einrichtungen für die Oberflächen-Hoch- und -Tieftemperaturmikroskopie

[724] [733] [748] [749] [752]

Einrichtungen für die Oberflächen-Hochtemperaturmikroskopie kann man in drei Gruppen einteilen:

1. Zusatzkammern zu serienmäßig gefertigten Metallmikroskopen;
2. speziell konstruierte Hochtemperaturmikroskope;
3. Hochtemperaturmikroskope, in denen die erhitzte Probe zusätzlich mechanischer Belastung (Zug, Druck, Biegung) ausgesetzt ist bzw. mit denen man die Hochtemperaturhärte bestimmt.

Aus jeder der drei Gerätegruppen sind zahlreiche Konstruktionen bekannt geworden. Es ist aber festzustellen, daß die Entwicklung kommerzieller Geräte zu aufwendigen, aber universell einsetzbaren Spezialkonstruktionen führt, bei denen durch die Kombination aufeinander abgestimmter Baugruppen hohe Leistung der optischen Ausrüstung, weitgehender Bedienungskomfort und geschlossene Formgebung wesentliche Charakteristika sind. Demgegenüber sind Einrichtungen für Tieftemperaturmikroskopie bisher ausschließlich als Zusatzeinheiten gemäß Gruppe 1 ausgeführt worden.

Einrichtungen für die Oberflächen-Hoch- und -Tieftemperaturmikroskopie kann man als die umfangreichsten und aufwendigsten der in diesem Abschnitt zu besprechenden Apparaturen ansehen. Dies liegt besonders darin begründet, daß man infolge der hohen Affinität erhitzter, unedler Metalle zum Sauerstoff die Versuche in Schutzgassphäre oder im Hochvakuum vornehmen muß. Vor allem die Konstruktion der Vakuum-Hochtemperaturkammer wirft einige Probleme auf; denn um den erforderlichen hohen Temperaturen standhalten zu können, müssen die Kammerwandungen wassergekühlt sein, was wiederum Forderungen an die Größe des freien Objektabstands der Mikroskopobjektive nach sich zieht, die besonders bei hohen Aperturen nur mit Spezialsystemen erfüllt werden können. Die Betätigung des erwähnten Sichtfensterwechsels und die Dimensionierung der Durchführungen zum Heizelement sind ebenso wie die Auslegung der Heizung kritische Punkte der Konstruktion. Man wird bei hochtemperaturmikroskopischen Arbeiten die Wahl des Heizverfahrens von der Eigenart der zu lösenden Aufgaben abhängig machen.

An die *mikroskopische Ausrüstung* dieser Anlagen werden im allgemeinen hohe Ansprüche gestellt, da man während eines Heizversuchs möglichst viele Verfahren zur Erkennung und Identifizierung von sich anbahnenden oder ablaufenden Veränderungen an der Oberfläche der Probe zur Verfügung haben möchte. Das Objekt kann man während eines Heizzyklus nur in geringem Maße beeinflussen. Demzufolge ist es der begründete Wunsch des Praktikers, außer im Hellfeld auch im Dunkelfeld, mit Phasen- und Interferenzkontrast und im polarisierten Licht experimentieren zu können. Ebenso berechtigt sind Forderungen nach fotografischer und mikrokinematografischer Registrierung der beobachteten Prozesse sowie nach Ansetzbarkeit von Demonstrationsansätzen und Fernsehkameras.

Diese weitgespannten Forderungen sind nur mit universell anwendbaren Serienmetallmikroskopen oder Spezialkonstruktionen zu erfüllen. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die erforderlichen Spezialobjektive, die freie Objektabstände $\geqq 15$ mm haben sollten und in deren Korrektion eine bestimmte Quarzglasdicke von etwa 2 mm (herrührend vom Sichtfenster der Vakuumkammer und dem wechselbaren Sichtfenster) einbezogen ist. Diesen Bedingungen ist bei geringen Aperturen mit Linsensystemen, bei hohen Aperturen zumeist nur mit katadioptrischen Mitteln zu entsprechen. Im Abschn. 2.5.3. werden die Vertreter einer solchen Objektivreihe beschrieben, die vom VEB Carl Zeiss JENA gefertigt wird. Höhere Aperturen als 0,50 sind relativ selten im Gebrauch. Wegen der häufig auftretenden Verwerfung der Probenoberfläche beim Erhitzen ist ihre Anwendung ohnehin beschränkt. Numerische Aperturen um 0,75 dürften die Grenze des Sinnvollen darstellen.

Eine weitere Frage der Ausrüstung hoch- und tieftemperaturmikroskopischer Einrichtungen ist die des zu wählenden *Mikroskoptyps*. Auflichtmikroskope sind entweder von aufrechter oder umgekehrter (Le-Chatelier-Typ) Bauart (s. Abschnitt 6.2.1.). Beide sind für die Kopplung mit

Tafel 10.1. Beurteilung der Bauprinzipien hoch- und tieftemperaturmikroskopischer Einrichtungen

Eigenschaft	Mikroskop von aufrechter Bauart	Mikroskop von umgekehrter Bauart
Kühlung der beobachteten Oberfläche durch die Probenhalterung	optimal gering	außer bei direkter Widerstandsheizung erheblich
Güte des Vakuums an der Probenoberfläche	optimal	Probenauflage kann Absaugung bei Gasausbrüchen hemmen
Justierung der Probenoberfläche zur optischen Achse des Mikroskops	durch entsprechende Vorrichtung optimal	bei hoher Fertigungspräzision der Teile der Probenunterlage nicht erforderlich; sonst schwer lösbar
Objektivwechsel	durch Objektivrevolver möglich	Revolverwechsel schwer zu realisieren
Beobachtung von Schmelzprozessen	möglich	im hängenden Tropfen; Gefahr des Herabfallens
Beobachtung kleiner Bruchstücke und Pulverproben	möglich	nur nach vorheriger Pressung möglich

Baugruppen der vorliegenden Art geeignet. In Tafel 10.1 ist versucht worden, die Eignung beider Bauprinzipien für diesen Anwendungszweck zu beurteilen.

Nach Abwägung aller Punkte scheint es dem Verfasser, als spräche die Mehrzahl für die aufrechte Bauart des Mikroskops bei hoch- und tieftemperaturmikroskopischen Einrichtungen für die Metallografie. Dem steht allerdings entgegen, daß man bei universell einsetzbaren Metallmikroskopen die umgekehrte Bauart bevorzugt.

Zum Geräteumfang von Hochtemperaturmikroskopen gehört neben der *Hochvakuumanlage* eine umfangreiche elektrische Ausrüstung, die die Aggregate zum Erzeugen der Heizspannung einschließlich Steuerungs- und Regelungsteilen, Vorschaltgeräte für die Mikroskopleuchten, Registriergeräte oder andere Temperaturmeßmittel sowie elektrisches Zubehör für die fotografische und mikrokinematografische Einrichtung umfaßt. Bei den Geräten der Gruppe 3 kommen weitere Zusatzeinheiten hinzu, und der Raumbedarf entspricht dann schon fast dem eines Elektronenmikroskops für mittlere Beschleunigungsspannungen [724] [733] [748] [750].

Eine für verschiedenartige Probenformen einsetzbare Zusatzeinrichtung für Auflichtmikroskope aufrechter Bauart ist der Mikroskop-Heiztisch 1750 von E. Leitz, Wetzlar (Bild 10.22).

Die Normalausführung mit Thermoelementen ist bis 1750 °C benutzbar; *Kossel* und *Anschütz* [714] führten jedoch mit pyrometrischer Temperaturbestimmung Untersuchungen bis 2700 °C durch. Man arbeitet im Hochvakuum (bis $1 \cdot 10^{-5}$ Torr $= 1$ mPa) oder in Schutzgassphäre ($\leqq 1$ at $= 100$ kPa Überdruck). Dabei wird mit indirekter Widerstandsheizung erwärmt. Um massive, zylindrische Proben ordnet man Heizfolien aus Platin, Tantal oder Molybdän an oder legt die Objekte auf entsprechend gebogene Heizbänder. Abschirmbleche um Probe und Heizelement verringern die Abstrahlung thermischer Energie. Wie schon beim Leitz-Heiztisch 1350 ist das Quarzsichtfenster exzentrisch und drehbar angeordnet, und man kann eine beim Versuch durch Bedampfung lichtundurchlässig gewordene Stelle desselben durch eine unbedampfte ersetzen. Das Mikroskop ist u.a. mit zwei Sonderobjektiven für Vergrößerungen bis 600× ausgerüstet. Man kann im Hellfeld, polarisiertem Licht und Phasenkontrast arbeiten. Zum Einsatz kommt weiterhin das typisierte Sortiment an Einrichtungen für Mikrofotografie einschließlich Laufbildaufnahmen.

Eine Zusatzeinrichtung zu einem Metallmikroskop umgekehrter Bauart (MeF 2 von C. Reichert, Wien) ist die vom gleichen Hersteller gefertigte Schnellregelheizkammer VACUTHERM (Bild 10.23) [733] [748].

Man geht wohl nicht zu weit mit der Aussage, daß ein erheblicher Teil des derzeitigen hochtemperaturmikroskopischen Erkenntnisschatzes durch die Arbeiten von *Gabler*, *Mitsche*, *Jeglitsch* u.a. [718]

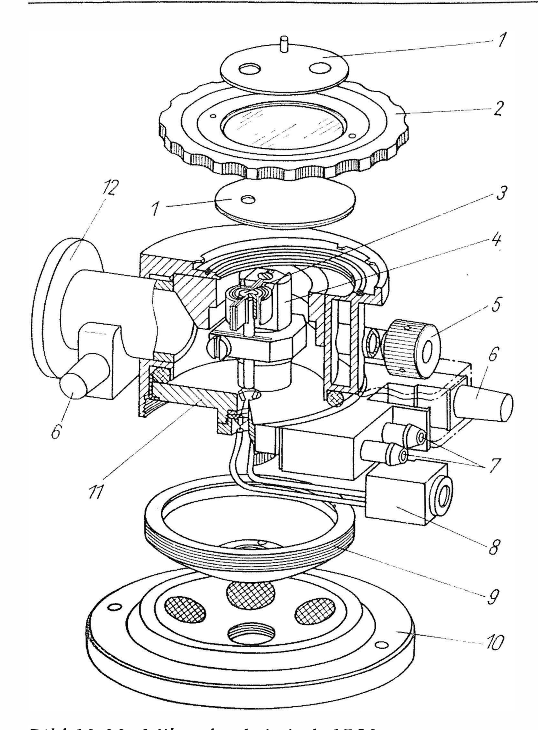


Bild 10.22. Mikroskopheiztisch 1750

1 Strahlungsschutz; *2* Deckel mit Quarzfenster; *3* Probe; *4* Elektrodengehäuse; *5* Schutzgasleitung; *6* Stromanschluß; *7* Kühlwasseranschlüsse; *8* Thermoelement; *9* Schraubkalotte; *10* Kugelschalentisch mit Haftmagneten; *11* Bodenplatte; *12* Vakuumanschluß

Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

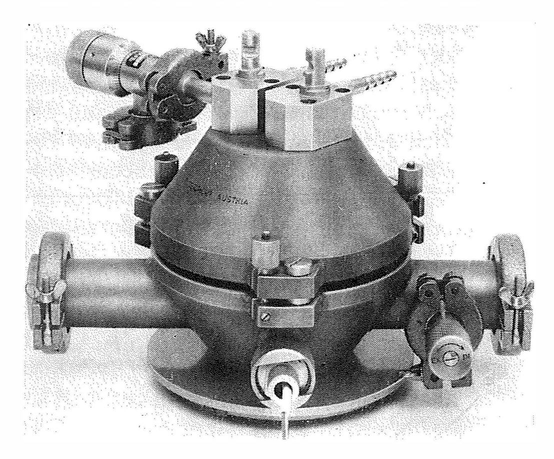
[720] [721] [733] mit dieser Gerätekombination gewonnen wurde. Die Hochtemperaturkammer besteht aus dem am Mikroskoptisch zu befestigenden Unterteil und dem Oberteil; beide sind zur Durchflußwasserkühlung doppelwandig ausgeführt. Der im Bild 10.23 am Unterteil rechts sichtbare Stutzen dient der Verbindung zum Hochvakuumaggregat (Grenzvakuum $1 \cdot 10^{-5}$ Torr = 1mPa); außerdem ist von dort die bereits mehrfach angeführte Wechselfenstervorrichtung zu betätigen. Die Probe ist zylindrisch mit einer Eindrehung zur Auflage auf einem Quarzring; zudem ist seitlich ein Schlitz zur Aufnahme des Thermoelements einzusägen. Ein zweiter, im Bild 10.23 links erkennbarer Stutzen dient der Anbringung eines Sichtglases zur Probenbeobachtung, eines Vakuummeßkopfes oder anderer zusätzlicher Bauelemente. Das Oberteil trägt die wassergekühlten Elektroden, deren eine durchbohrt ist, so daß man über ein angesetztes Ventil die Kammer mit Schutzgas spülen oder die Probe schnell abkühlen kann. Diese ist von Heizbändern aus hochschmelzenden Metallen umhüllt, und man erzielt hohe Temperaturanstiegsraten. Während für Vergrößerungen bis 250× normale Auflichtobjektive zum Einsatz kommen, mit denen die Beobachtung im Hell- und Dunkelfeld sowie Phasen- und Interferenzkontrast möglich ist, hat man für Werte bis 500× ein spezielles Spiegelobjektiv (freier Objektabstand 8 mm), das allerdings nicht mehr für Dunkelfeld geeignet ist. Die erzielbare Maximaltemperatur beträgt 1800 °C. Für Beleuchtung, fotografische und Laufbildregistrierung werden handelsübliche Einheiten verwendet.

Die Konstruktion dieser beiden Hochtemperaturkammern kann man im wesentlichen als charakteristisch für alle aus der Literatur bekannten ansehen. Bei älteren Typen verwendete man allerdings zur indirekten Widerstandsheizung statt der Heizbänder Heizdrähte oder -spiralen, die auf keramische Träger gewickelt waren [750].

In manchen Fällen wird bei Blechproben auch direkte Widerstandsheizung eingesetzt [771]. *Schmidt* und *Höss* [754] schufen ein Hochtemperaturmikroskop für große Blechproben (Dmr. 25 mm, 2 mm dick) und Temperaturen bis 1400 °C. Für die Vereinigung von Vakuumkammer und einem Objektiv mit etwa 10 cm Arbeitsabstand fanden *Olson*, *Brixner* und *Smith* eine bemerkenswerte Lösung [742]. Sie benutzten einen im Deckelteil der Vakuumkammer befestigten elliptischen Spiegel, in dessen einem Brennpunkt sich die Probe befindet. Im anderen, außerhalb der Kammer, entsteht das Zwischenbild. Die Vergrößerung nimmt bei einer Objektivapertur von 0,47 Werte zwischen 30 × und 600 × an; man erhitzt das Objekt bis 2500 °C. Durch eine Boh-

Bild 10.23. Schnellregelheizkammer VACUTHERM

Firma C. Reichert, Optische Werke, Wien, Werkfoto



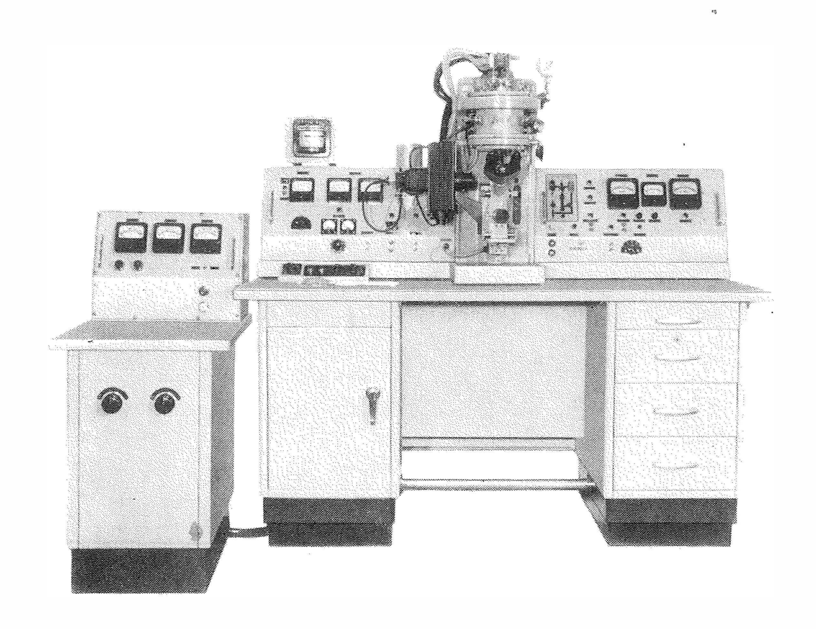


Bild 10.24 Hochtemperaturmikroskop HM-4 mit Zusatzgerät für Folienheizung
Union Optical Co., Tokyo, Werkfoto

rung des Ellipsenspiegels wird die Probe beleuchtet.
Während die bislang beschriebenen Hochtemperaturkammern der eingangs des Abschnitts klassifizierten Gruppe 1 angehören, ist das Hochtemperaturmikroskop Modell HM-4 der Union Optical Co., Tokyo (Bild 10.24), zur Gruppe der Spezialmikroskope für Hochtemperaturmikroskopie zu rechnen [679] [760].
Das Gerät ist in Normalausführung für Temperaturen bis 1500°C ausgelegt. Zahlreiche Zusatzeinheiten zum Gerät garantieren einen breiten Anwendungsbereich. Durch den Einbau des Hochvakuumaggregats (Grenzvakuum $2 \cdot 10^{-5}$ Torr = 2,5 mPa) und der Stromversorgung im Instrumententisch hat das Mikroskop einen geschlossenen Aufbau. Im Arbeitspult sind Meßinstrumente und Bedienelemente übersichtlich untergebracht. Außer im Hochvakuum kannman die Probe auch im Schutzgasstrom erhitzen und abkühlen. Für die Heizung der Präparate hat man eine interessante Lösung gefunden; es lassen sich verschiedene Heizelemente in eine Halterung einsetzen, die die im Bild 10.4 a, b und e gezeigten Prinzipien verwirklichen. Dadurch sind Zylinder- und Blechproben ebenso zu untersuchen wie solche, die lediglich einen Anschliff haben. Die mikroskopische Ausrüstung gestattet Hellfeldbeobachtung mit Vergrößerungen zwischen 50× und 250× ; es kommen zwei Spezialobjektive HM 5 × /0,10 und LD 10 × /0,25 zum Einsatz. Fotografische und mikrokinematografische Registrierung sind möglich. Die Bedampfung des Vakuumkammer-Sichtfensters wird durch eine exzentrisch angeordnete, drehbare Quarzglasscheibe verhindert.
Als Zusatzeinheit ist die bereits erwähnte Einrichtung für die Heizung durch Folien aus hochschmelzenden Metallen oder direkter Widerstandsheizung (bis 1850 °C) anzufügen. Zur Stromversorgung dient ein spezielles Netzgerät (links im Bild 10.24). Man kann die Vakuumkammer weiterhin durch eine Schmelzpunkteinrichtung ersetzen, die mit den im folgenden Abschnitt beschriebenen Hochtemperaturmikroskopen vergleichbar ist. Durchlichteinrichtung, elektronisches Temperatur-Registriergerät mit Grenzwertschalter für die Heizung und eine Fernsehanpassung sind weitere Ergänzungsbaugruppen.
Durch drei weitere Zusatzeinheiten zum Hochtemperaturmikroskop HM-4 entstehen Geräte, die der Gruppe 3 der Klassifikation entsprechen [679] [704] [772].
Man ersetzt dabei das Unterteil der Vakuumkammer und erhält so die Möglichkeit, die Probe unter *Druck-*, *Zug-* und *Biegebelastung* zu beobachten. Die Druckbelastung der Objekte (3 mm × 3 mm × 10 mm) bis 200 kp (≈ 2 kN) erzeugt man durch Federn, die mit Schraubelementen zusammengepreßt werden. Druckanzeiger und ein Feinzeiger zum Bestimmen der Probenlänge auf 0,01 mm vervollständigen die Einrichtung. Die bis

1 500°C zu erhitzende Probe liegt zwischen zwei Heizelementen mit Beobachtungsöffnung wie in einem Muffelofen. Ein ähnlich ausgeführtes, zweites Vakuumkammer-Unterteil gestattet zusätzlich zur Druckbelastung noch die Beanspruchung auf Biegung. Untersuchungen bei Zugbelastung ermöglicht das dritte Vakuumkammer-Unterteil einschließlich ansetzbarer Belastungsvorrichtung. Massestücke dienen als Last, die in Stufen verändert werden kann, in der Regel jedoch während eines Versuchs konstant ist. Die Kraft greift über Zugseile und eine Rollenvorrichtung an der Probeneinspannung an. Die Maximalspannung der doppel-T-förmigen Probe wird mit 11,5 kp/mm^2 ($\approx$ 115 N/mm^2) angegeben [772]. Das Heizelement ist wie im Fall der Druckbelastung ausgeführt. Die erzielbare Höchsttemperatur beträgt ebenfalls 1500°C. Die Objektdehnung wird mit Feinanzeigern auf 0,01 mm abgelesen.

Die Hochtemperaturkammer VACUTHERM modifizierte *Thorsen* [767] zur Untersuchung der Warmrißbildung in Schweißnähten.

Kirchner und *Ripling* [711] berichten über die Konstruktion einer Mikroskop-Hochtemperaturkammer, in der die Probe mit einer Spannmutter relativ hoch belastet werden kann. Die Kraftmessung erfolgt mit Dehnungsmeßstreifen, die Temperaturbestimmung mit einem auf der Probe angepunkteten Thermoelement.

Während die beiden letztgenannten Einrichtungen an Mikroskopen umgekehrter Bauart zu benutzen sind, ist die von *Reinacher* [747] entworfene einfache *Heizkammer für Mikrozeitstandversuche* an Metallbändern für aufrechte Mikroskope vorgesehen.

Feltham [688] beschreibt eine Zusatz-Vakuumkammer zu einem kommerziellen Tensometer, wobei die auf maximal 700 °C erhitzbare, band- oder stabförmige Probe bei bis zu 500facher Vergrößerung betrachtet werden kann. *Kasen*, *Ford*, *Taggart* und *Polonis* [710] entwickelten eine umfangreiche Apparatur für die Hochtemperaturmikroskopie zugbeanspruchter Objekte, die mit hydraulischen Mitteln und indirekter Widerstandsheizung (Höchsttemperatur 1100 °C) durchgeführt wird.

Man arbeitet mit konstanter oder kontinuierlich steigender Kraft. Die Dehnungsgeschwindigkeiten betragen 2,5 · 10^{-5} bis 2,5 · 10^{-2} mm/s. Es

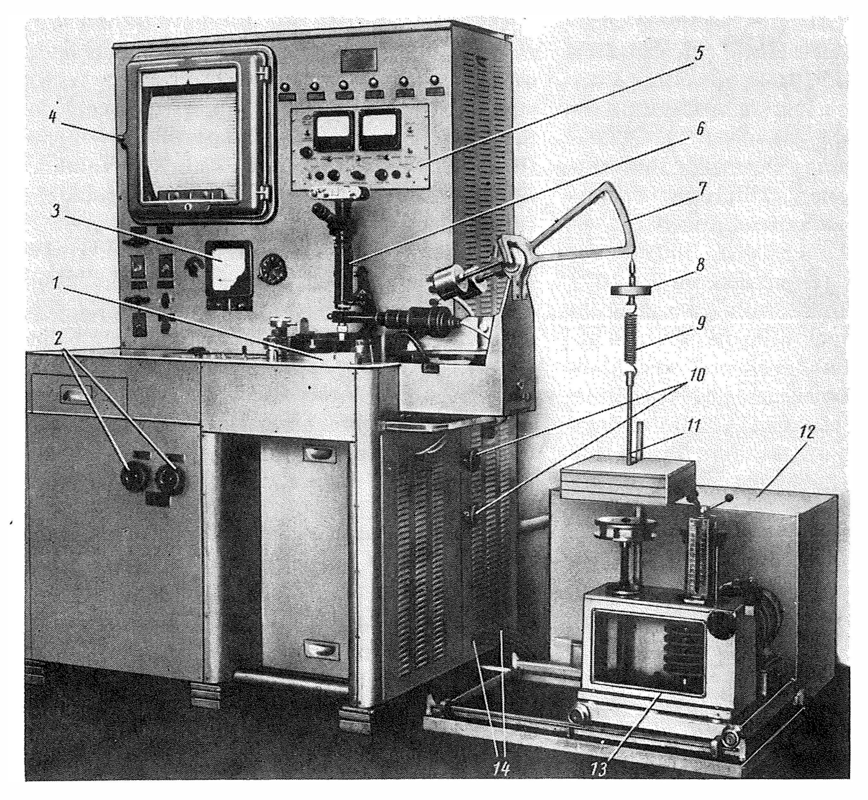


Bild 10.25 Hochtemperaturmikroskop IMASCH-5S-65 (Ausrüstung für Zugbelastung der Proben)
1 Vakuumkammer; *2* Bedienelemente der Heizung; *3* Spannungsanzeiger; *4* Temperaturschreiber; *5* Vakuummeter; *6* Mikroskop; *7, 8, 9, 10, 11* Belastungseinrichtung mit Massestücken; *12* Vorvakuumpumpe; *13* Belastungseinrichtung mit kontinuierlich steigender Last; *14* Kühlwasseranschlüsse

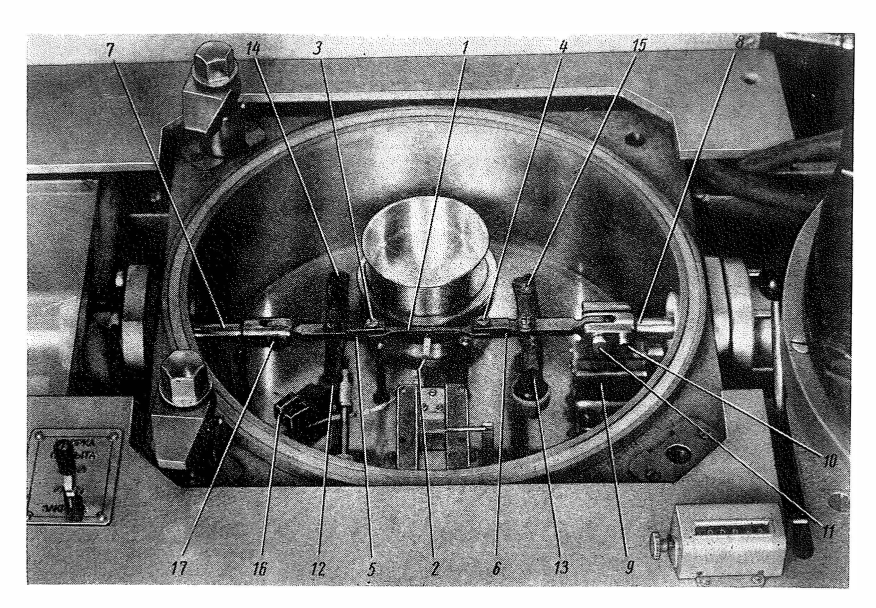


Bild 10.26
Hochtemperaturmikroskop IMASCH-5S-65
Blick in die geöffnete Vakuumkammer
1 Probe;
2 Thermoelement;
3, 4, 5, 6 Probenbefestigung;
7, 8, 9, 10, 11 Verbindungen zur Tensometer- und Belastungseinrichtung;
12, 13, 14, 15 Stromzuführungen;
16, 17 Thermopaar-Anschweißvorrichtung

werden mehrere Thermoelemente an die Probe angeschweißt, um einerseits den sich einstellenden Temperaturgradienten zu erfassen und zum anderen den Heizstrom zu steuern. Belastung und Laständerung werden mit Dehnungsmeßstreifen registriert; ebenso die Probendehnung in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit. Fotografische und Laufbildregistrierung im Hellfeld und polarisierten Licht sind möglich.

Maßgebenden Einfluß auf die Entwicklung der Hochtemperaturmikroskopie hatten und haben die Arbeiten, die im Moskauer Institut für Maschinenkunde von *Losinski* [724] und Mitarbeitern ausgeführt wurden. Die im Werk für Feinmeßgeräte, Frunse, gefertigte Einrichtung IMASCH-5S-65 [727] ist für die direkte Beobachtung von Proben unter Zugbelastung bis zu Temperaturen von 1500 °C bestimmt.

Im Bild 10.25 wird die Anlage in der Ausrüstung für abstufbare, gleichbleibende Belastung mit Gewichtskräften bis 500 kp ($\approx$ 5 kN) gezeigt. Die Probe hat Doppel-T-Profil und wird durch direkten Stromdurchgang erhitzt. Mit einer zweiten Vorrichtung lassen sich Proben mit variablen Geschwindigkeiten zwischen 0,03 und 4200 mm/h dehnen. Zur Kraftbestimmung dienen Dehnungsmeßstreifen in einer Brückenschaltung. Die Dehnung selbst wird mit einem Feinzeiger und Mikrohärteeindrücken, die vor dem Versuch auf der Probenoberfläche angebracht wurden, bestimmt. Man beobachtet mit einem Mikroskop aufrechten Typs. Es werden vier Linsenobjektive mit Arbeitsabständen $\geqq$ 14 mm und numerischen Aperturen zwischen 0,12 und 0,42 eingesetzt. Einen Blick in die Kammer vermittelt Bild 10.26. Das zur Temperaturbestimmung benutzte Thermopaar ist an die Probe angeschweißt; dessen Anzeige wird mit einem Schreiber registriert und steuert gleichzeitig einen Zweipunktregler für die Heizstromstärke. Mikrofotografische und mikrokinematografische Einrichtungen vervollständigen das Gerät.

Im Gegensatz zur Apparatur IMASCH-5S-65 liegen die Mittenachsen der Vakuumkammern bei den Einrichtungen IMASCH-5M und IMASCH-8 [724] ebenso horizontal wie das Mikroskop. Die Probe wird mit Gewichtskräften auf Zug beansprucht ($\leqq$ 60 kp/mm^2 $\approx$ 600 N/mm^2; Maximaltemperatur 1100 °C). IMASCH-8 bietet dabei die Möglichkeit, neben der lichtmikroskopischen Beobachtung mit Hilfe einer Feinfokus-Röntgenröhre Strukturanalysen nach der Rückstrahlungsmethode von *Sachs* durchführen zu können.

In den Leningrader Optischen Werken wurde aus dem Gerätetyp IMASCH-5M das vom Prinzip her ähnliche Hochtemperaturmikroskop UVM-1 [724] entwickelt, bei dem die Vakuumkammer in einem Rahmen ähnlich dem handelsüblicher Zerreißmaschinen angeordnet ist. Das Mikroskop gestattet auch Beobachtungen im Dunkelfeld. Maximal kann man bis 3000 kp $\approx$ 30 kN belasten; die höchste einstellbare Temperatur beträgt allerdings nur 1100 °C. Bei einer vom gleichen Prototyp ausgehenden Institutsentwicklung

IMASCH-18 [728] verwendet man ein ähnliches Mikroskop UVT-1 mit langbrennweitiger Optik; es ist bis zu Temperaturen über 3000 °C benutzbar. Oberhalb 2100 °C ersetzt man die thermoelektrische Temperaturmessung durch die pyrometrische. Zur Beleuchtung dient bis 2100 °C eine spezielle Hochleistungs-Gasentladungsleuchte, bei höheren Temperaturen bildet man das Objekt im Eigenlicht ab.

Die Untersuchung von Objekten bei *Wechselbiegebeanspruchung* ist mit der von *Losinski* und *Romanow* [725] entwickelten Einrichtung IMASCH-10 möglich. Die in einer Vakuumkammer einseitig eingespannte Probe (1 mm × 20 mm × 90 mm) wird am freien Ende über eine Exzenteranordnung mit maximal 3000 Lastwechseln je Minute beansprucht. Man arbeitet mit indirekter Widerstandsheizung und erreicht maximal 1200 °C. Als Lichtquelle dient eine Impulsleuchte, die synchron zur Biegewechselvorrichtung gezündet wird. Die mikroskopische Beobachtung wird bei Vergrößerungen bis 200fach vorgenommen.

Thermische Wechselbeanspruchung, die einer mechanischen vergleichbar ist, führte *Losinski* [724] mit einer anderen Apparaturvariante im Vakuum oder unter Schutzgas durch.

Als mechanische Belastung erhitzter Proben mit meßbarer Wirkung ist bei hochtemperaturmikroskopischen Untersuchungen auch die *Härtebestimmung* anzusprechen. *Losinski* und *Mirotworski* entwickelten auf der Basis der IMASCH-Serie den Gerätetyp IMASCH-9 [726] für die Bestimmung der Mikrohärte und des Verhaltens unter Zugbelastung ($\leqq$ 60 kp/mm^2 $\approx$ 600 N/mm^2) im Vakuum bis 1300 °C. Die Belastung des Eindringkörpers variiert zwischen 2 und 50 p $\approx$ 2 und $50 \cdot 10^{-2}$ N. Das Mikrohärte-Prüfgerät ist so konstruiert, daß man entweder die interessierende Stelle der Flachprobe beobachten oder dort einen Mikrohärteeindruck ausführen kann. Dieser Wechsel wird mit einem Drehkonus im Deckelteil der Vakuumkammer vorgenommen, der zur Mittenachse der Kammer exzentrisch angeordnet ist. Als Eindringkörper verwendet man Diamant und synthetischen Saphir in Molybdänhalterungen. Oberhalb 900 °C ist Diamant nicht mehr sicher einsatzfähig, weil in vielen Fällen der Kohlenstoff unter Karbidbildung in das Objekt abdiffundiert. Saphir-Eindringkörper benutzten die Autoren bis 1300 °C. Die Ausmessung der Härteeindrücke geschieht während der Versuche, so daß Einflüsse durch Oberflächendiffusion o.ä. vermieden werden. Erwähnung soll an dieser Stelle noch der handelsübliche Hochtemperatur-Härteprüfer der Nippon Kogaku K.K., Tokyo, finden, dessen Belastungsstufen (50, 100, 300 p $\approx$ 0,5; 1; 3 N) schon in das Gebiet der Kleinlasthärte hinüberreichen. Die zylindrische Probe kann bis 1450 °C im Vakuum erhitzt werden. Die mikroskopische Vergrößerung beträgt 100 × bzw. 300 ×.

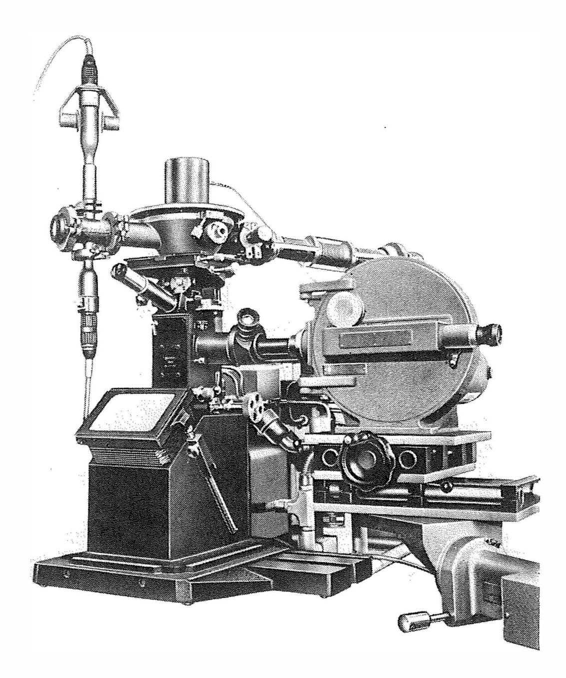


Bild 10.27. Tieftemperaturmikroskopische Einrichtung mit Fastax-High Speed Camera
Firma C. Reichert, Wien, Werkfoto

Man hat auch versucht, von der bloßen, gleichsam qualitativen Beobachtung von Gefügeänderungen an der Objektoberfläche zu meßbaren und damit quantitativen Informationen zu gelangen.

So kombinierten *Brandstaetter*, *Mitsche* und *Gabler* [658] das Hochtemperaturmikroskop mit einer *Magnetsonde*. *Dichtl* und *Jeglitsch* [667] berichten über die Kopplung von Hochtemperaturmikroskopie und *Differentialthermoanalyse*. *Kulmburg*, *Gabler* und *Korntheuer* [720] schließlich steigerten den Bedienungskomfort des Reichert-Hochtemperaturmikroskops durch Zusatzeinrichtungen *(Heizstromsteuerung, Temperatureinspiegelung in das Bildfeld)* und wiesen damit Wege für die zukünftige Geräteentwicklung.

In den letzten Jahren wurde die Mikroskopie auch für *Untersuchungen des Verhaltens von Werkstoffen bei tiefen Temperaturen* herangezogen. Dabei koppelte man vielfach die Einrich-

tungen für Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie. Nach [734] ersetzt man hierzu das Oberteil der bereits mehrfach erwähnten Heizkammer VACUTHERM durch einen doppelwandigen Kühleinsatz, in dem die Probe direkten Kontakt mit dem Kühlmedium hat. Damit man den Abkühlungsvorgang regulieren kann, ist der Kühleinsatz noch mit einer elektrischen Heizung ausgestattet. Im Bild 10.27 wird diese tieftemperaturmikroskopische Einrichtung gezeigt; gleichzeitig ist eine Laufbildkamera mit hoher Bildfrequenz (Fastax-High Speed Camera, maximal 8000 Bilder/s) angesetzt. Zur Beleuchtung benutzt man eine überlastbare Hochleistungs-Xenonlampe.

Demgegenüber vereinigte *Cech* [662] Hoch- und Tieftemperaturkammer in einer Konstruktion, so daß das Objekt unmittelbar von hohen bis zu tiefen Temperaturen untersucht werden kann.

Die Übersicht im Bild 10.28 stellt einen Versuch dar, die umfangreichen Arbeiten auf diesem Sektor der Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie zusammenzufassen. Man kann z. Z. zum Stand der Entwicklung dieses Fachgebietes sagen, daß die bloße Beobachtung von Gefügeumwandlungen gegenüber den Verfahren etwas zurückgetreten ist, mit denen quantitative Aussagen mit hohem Informationsgehalt gefunden werden können. Dies entspricht wohl dem Übergang dieser Untersuchungsmethoden aus der Sphäre der reinen in die der angewandten Grundlagenforschung und z. T. schon in die der betrieblichen Routineprüfung. Eine weitere Ursache für diesen Wandel dürfte auch darin zu suchen sein, daß im Hochtemperaturmikroskop nur die Oberfläche des Objekts, nicht aber dessen Inneres überschaubar ist. Man muß stets sehr genau prüfen, ob die auftretenden Oberflächeneffekte für die im Probeninneren ablaufenden Prozesse repräsentativ sind. Untersuchungen in dieser Richtung, die gleichzeitig die *Grenzen der Hoch-* und *Tieftemperaturmikroskopie* abstecken, sind vor allem an der Montanistischen Hochschule in Leoben von *Mitsche* und *Jeglitsch* [733] durchgeführt worden. In erster Linie sind folgende Punkte zu beachten:

1. Änderung der Probenzusammensetzung an der Oberfläche. Sie kann durch sog. Auflegieren erfolgen, indem z.B. aus dem Heizelement abdampfende Metallatome in das Kristallgitter der Probe eindiffundieren. Tritt dies in stärkerem Maße auf, kann sogar der zunächst vorliegende Legierungstyp verändert werden. Umgekehrt kann sich durch selektive Verdampfung einzelner Komponenten die Zusammensetzung an der Probenoberfläche ändern (Ablegieren). In dieser Richtung wirkt z.B. die Entkohlung der Oberflächen speziell bei Eisenwerkstoffen durch den Restsauerstoff des Vakuums bzw. Schutzgases.
2. Störungen der ablaufenden Vorgänge durch die das Objekt umgebende Gassphäre können in mannigfacher Weise eintreten. Kritisch dürfte dabei die Bildung von Oxiden bzw. Suboxiden durch den Restsauerstoff des Schutzgases oder im Vakuum sein (s. Abschn. 10.2.).
3. Eine dritte Gruppe von Phänomenen, die die Oberflächenvorgänge beeinflussen, leitet sich davon ab, daß an der Oberfläche eines Objekts grundsätzlich andere Verhältnisse herrschen als in dessen Innerem. So laufen mit Volumenzunahme verbundene Umwandlungen an der Oberfläche schneller ab als im Probeninnern, solche unter Volumenverminderung entsprechend langsamer. Durch energetische Unterschiede herrschen an der Probenoberfläche andere Keimbildungsbedingungen als im Innern, wozu noch die Wirkung adsorbierter Schichten kommen kann. Auch bei Diffusionsvorgängen können sich Verschiebungen dadurch ergeben, daß sich Oberflächen- und Volumendiffusion stark unterscheiden.

Einsatzbereiche von Einrichtungen für die Oberflächen-, Hoch- und Tieftemperaturmikroskopie
Untersuchungen des Sinter-, Schmelz- und Erstarrungsverhaltens
Thermische Ätzung, Anlaufvorgänge durch selektive Oxydation
Feststellung und Beobachtung von Gefügeumwandlungen (subjektive Beobachtung, fotografische Registrierung, Mikrokinematografie, Magnetsonde, DTA)
Untersuchung von Zustandsdiagrammen
Grenzflächen- und Diffusionsprozesse
Untersuchung des Kornwachstums, der Rekristallisation sowie von Ausscheidungs-, Lösungs- und Entmischungsvorgängen
Veränderung der Festigkeitswerte in Abhängigkeit von der Temperatur (Zug-, Druck- und Biegebelastung, Mikrohärte, Wechselbeanspruchung)
Vorgänge im Gefüge bei konstanter und veränderlicher mechanischer Belastung

Bild 10.28. Einsatzbereiche der im Abschn. 10.1.3.4. beschriebenen hoch- und tieftemperaturmikroskopischen Einrichtungen

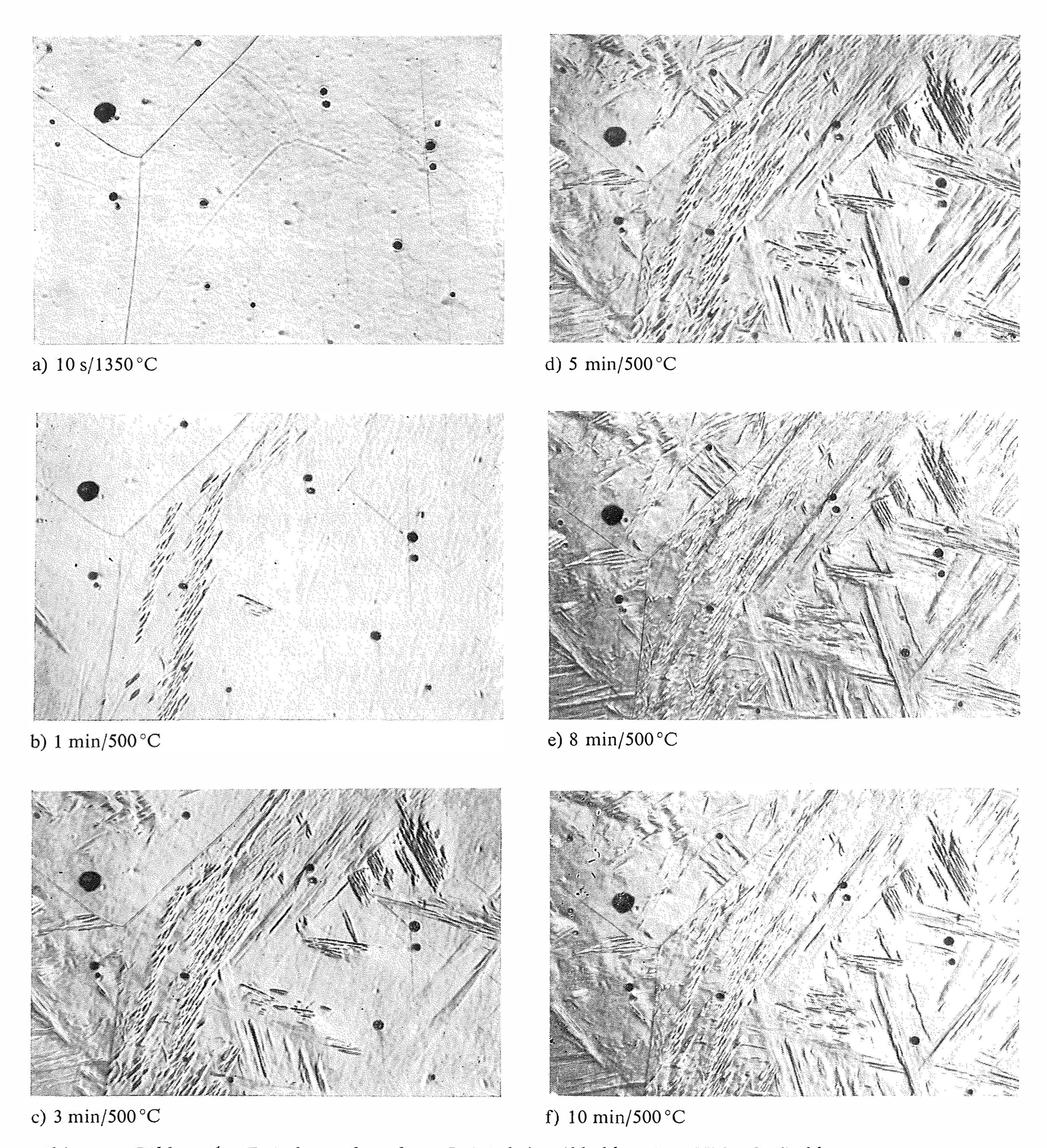


Bild 10.29. Bildung des Zwischenstufengefüges Bainit beim Abkühlen eines NiCrMo-Stahls (Hochtemperaturmikroskop HM-4 der Union Optical Co., Tokyo; Vakuum; 320:1)

Eine der wesentlichen Erscheinungen, die die Beobachtung der Veränderungen in Präparaten im Hochtemperaturmikroskop ermöglicht, ist die *thermische Ätzung*, worunter man das Sichtbarwerden der Korngrenzen in Form eines Oberflächenreliefs an der Schliffoberfläche beim Erhitzen versteht [706] [733]. Man kann dies als den Bildungsmechanismus von Gleichgewichtsflächen mit minimaler, freier Energie im Korngrenzenbereich bezeichnen, der vor allem über die Oberflächendiffusion vor sich geht. Das Schliffbild erhitzter Proben sowie *Kornwachstum* [718] [754], *Rekristallisation* [700] und *Gefügeumwandlungen* sind so (besonders bei Dunkelfeldbeobachtung) [722] [724] [729] [733] [752] gut im Mikroskop zu verfolgen [718] [724] [733]. *Ausscheidungs-* und

Lösungsprozesse [737] sowie Gefügeumwandlungen, die mit Volumenänderungen der kristallografischen Elementarzelle verbunden sind und dadurch ein Oberflächenrelief erzeugen, lassen sich im mikroskopischen Bild besonders gut mit Phasen- oder Interferenzkontrast sowie im Dunkelfeld nachweisen. Als Beispiel ist im Bild 10.29 die isotherme Umwandlung eines NiCrMo-Stahls wiedergegeben, und zwar die Bildung des Zwischenstufengefüges Bainit, das ein Gemenge von Ferrit und Zementit ist und mit seinem nadligen Aussehen dem Martensit ähnelt, jedoch geringere Härte als dieser hat. Die Bainitbildung ist in der Technik von erheblicher Bedeutung; man kann sie als Vergütungsvorgang ansehen.

Die Untersuchung des *Schmelz-* und *Erstarrungsverhaltens* ist einerseits von besonderer Bedeutung für die Aufstellung von Zustandsdiagrammen, zum anderen kann sie bei der Aufklärung von Schadensfällen (Warmbrüchigkeit durch Aufschmelzen einzelner Gefügekomponenten) wertvolle Dienste leisten [707] [719]. Der Beobachtung sind auch *Diffusions- und Grenzflächenvorgänge* zugänglich, die z. B. das Sinterverhalten von Stoffen beeinflussen. Hier eröffnen sich weitere Anwendungsgebiete der Hochtemperaturmikroskopie für Untersuchungen an keramischen und pulvermetallurgisch hergestellten Werkstoffen [735] [768].

Mit der Untersuchung von Objekten unter *Zug- Druck- oder anderer mechanischer Belastung* hat ein wichtiger Einsatzbereich Eingang in die hoch- und tieftemperaturmikroskopische Praxis gefunden [724] [749], wodurch die Prüfmethoden der Oberflächen-Hoch- und -Tieftemperaturmikroskopie einen festen Platz in der metallkundlichen Werkstoffprüfung errungen haben.

10.1.3.5. Hochtemperaturmikroskope mit horizontal liegender Längsachse [689] [692]

Die letzte Gruppe hochtemperaturmikroskopischer Geräte ist in erster Linie für die Untersuchung des Verhaltens anorganischer Stoffe bei Erhitzung und Abkühlung bestimmt. Als Proben kommen feste Stoffe – kompakte Stücke, in bestimmte Form gepreßte Pulver – zum Einsatz. Es ist eine Eigenart dieser Gerätegruppe, daß man mit relativ geringen Vergrößerungen arbeitet, weil man die Proben gern als Ganzes betrachten möchte und des weiteren daran interessiert ist, aus den Untersuchungen Schlüsse auf die Arbeitsweise großtechnischer Anlagen (Heizkraftwerke, keramische Werke, Glaswerke) zu ziehen und somit in den hochtemperaturmikroskopisch geprüften Proben einen aussagekräftigen Durchschnitt über das in der betrieblichen Praxis in großen Mengen verwendete Material voraussetzen muß. Aus dieser Zielsetzung ist sogleich eine weitere Forderung an Hochtemperaturmikroskope dieser Bauart abzuleiten, und zwar die nach einer Dokumentation mit hohem Informationsgehalt. Aus diesem Grund gehört eine fotografische Einrichtung stets zum Lieferumfang der Geräte. Außer der Abbildung der Probe strebt man an, zumindest die Temperaturanzeige gleichzeitig mit zu registrieren.

Nach ersten Arbeiten von *Nacken* [736] und *Endell* [686] erhielt dieser Zweig der Hochtemperaturmikroskopie neue Impulse, als man mit Routineuntersuchungen des *Ascheschmelzverhaltens* technisch genutzter, fester Brennstoffe begann. Deren Eigenschaften werden sowohl von der enthaltenen organischen Kohlensubstanz als auch von den mineralischen Bestandteilen bestimmt. Für den kontinuierlichen Betrieb industrieller Aggregate ist jedoch vorwiegend das Verhalten der mineralischen Rückstände (Asche, Schlacke) von Interesse [762] [763].

Bevor auf die Anwendungsgebiete der Hochtemperaturmikroskope mit horizontal liegender Längsachse eingegangen wird, soll zunächst der Aufbau eines typischen Geräts, des Hochtemperaturmikroskops MHO 2 des VEB Carl Zeiss JENA (Bild 10.30), beschrieben werden [738].

Es ist mit seinen Baugruppen – Grundkörper mit Betrachtungsmikroskop und fotografischer Einrichtung, Horizontalofen und Leuchte – auf einer Schiene für optische Bänke aufgebaut. Die elektrischen Zusatzaggregate für Ofenheizung und Beleuchtung sind in zwei Vorschaltgeräten untergebracht. Das Mikroskop hat eine feste Zuordnung Okular-Objektiv; Vergrößerung (12,5 × bis 25 ×) und Abbildungsmaßstab (4 : 1 bis 8 : 1) werden durch Betätigen eines Vierfach-Vergrößerungswechsels verändert. Man kann mit Durchlicht- oder Auflichtbeleuchtung arbeiten. Da die mit einer Handpresse aus den Brennstoffrückständen angefertigten Probekörper undurchsichtig sind, beobachtet man häufig nur deren Schattenbild und stellt an den mit einer Netzteilung im Okular verfolgbaren Größenänderungen den Verlauf von Reaktionen fest. Bei fotografischer Dokumentation ist die Einspiegelung der Temperaturanzeige in das Bildfeld von besonderem Wert. Weiterhin sind bis 1000°C orientierende polarisationsoptische Untersuchungen durchführbar.

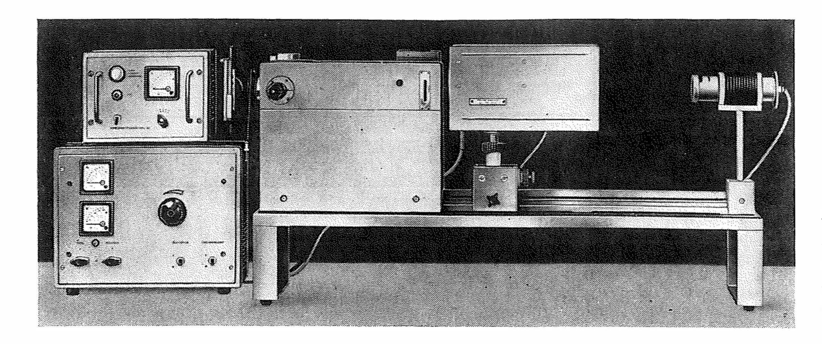


Bild 10.30
Hochtemperaturmikroskop MHO 2
VEB Carl Zeiss JENA, Werkfoto

Der im Bild 10.30 durch Schutzbleche verdeckte Horizontalofen 1600°C ist ein Rohrofen (Bild 10.4a), in den das auf einem Keramik-Objektträger befindliche Objekt mit dem Präparatwagen eingefahren wird. Das Thermoelement liegt in der Nähe des Objekts, ohne dieses zu berühren. Das Ofeninnere wird mit Sichtfenstern aus geschmolzenem Quarz verschlossen. Am Ofen sind Zuleitungs- und Ableitungsrohre für Gase vorgesehen, so daß man in gewünschter Gassphäre (z.B. reduzierend) arbeiten kann. Die Maximaltemperatur des Ofens beträgt 1600°C. Das Erhitzungsmikroskop der Firma E. Leitz, Wetzlar, [671] kann jedoch auch mit Horizontalöfen ausgerüstet werden, die maximal 1750°C erreichen.
Im Bild 10.31 sind die wesentlichen Anwendungen von Hochtemperaturmikroskopen dieser Geräteklasse zusammengefaßt. In erster Linie setzt man sie für Untersuchungen des Sinter-, Erweichungs- und Schmelzverhaltens vorwiegend anorganischer Stoffe nach standardisierten Prüfverfahren ein [692] [730]. Hierzu muß man einige neue Begriffe definieren. Reine Stoffe schmelzen so, daß bei einer bestimmten Temperatur – der Schmelztemperatur – der Übergang vom kristallinen in den schmelzflüssigen Zustand erfolgt. Gemische hingegen schmelzen innerhalb eines mehr oder weniger ausgedehnten Temperaturintervalls; und da die mit Hochtemperaturmikroskopen dieses Typs untersuchten Objekte häufig Gemische aus mehreren Komponenten sind, hat man versucht, unter Berücksichtigung der beim Schmelzen von Proben mit vorgeschriebenen Abmessungen tatsächlich beobachtbaren Phänomene bestimmte, reproduzierbare Temperaturwerte zu definieren, und zwar u.a. [692] [745] [762] [763]:

Sinterpunkt

Temperatur, bei der der Probekörper seine Form ändert (Höhenabnahme), ohne daß sich scharfe Konturen runden;

Anwendungsgebiete der Hochtemperaturmikroskope mit horizontal liegender Längsachse
Untersuchung des Sinter-, Erweichungs- und Schmelzverhaltens fester Stoffe (Brennstoffrückstände, Schlakken, keramische Rohstoffe, reine Stoffe, Verbindungen)
Thermisches Verhalten von Kristalliten, kompakten Stücken, Einschlüssen
Bestimmung des Verbrennungs- und Blähverhaltens von Kohle
Feststellung von Gefüge- und Modifikationsänderungen
Untersuchungen auf Feuerfestigkeit und Beständigkeit keramischer Werkstoffe gegen Chemikalien und Schlacken
Bestimmung des Benetzungsverhaltens (Randwinkelmessungen)
Schwindungs- und Dehnungsverhalten keramischer Stoffe
Bestimmung des Druckerweichungsverhaltens
Spannungsverhalten von Verschmelzungen
Untersuchung schmelzender Glasgemenge (reale und Modellschmelzen)
Aufklärung von Entglasungserscheinungen
Bestimmung der Zähigkeitstemperatur von Gläsern
Untersuchung von Zustandsdiagrammen

Bild 10.31. Einsatzbereiche der im Abschn. 10.1.3.5. beschriebenen Hochtemperaturmikroskope

Erweichungspunkt

Temperatur, bei der sich scharfe Kanten und hervorstehende Spitzen des Probekörpers runden oder in stärkerem Maße Bläherscheinungen auftreten;

Halbkugelpunkt

Temperatur, bei der der Probekörper zur Halbkugel bzw. zu einem halbkugelförmigen Gebilde zusammengeschmolzen ist; auch als Schmelzpunkt des Gemisches bezeichnet;

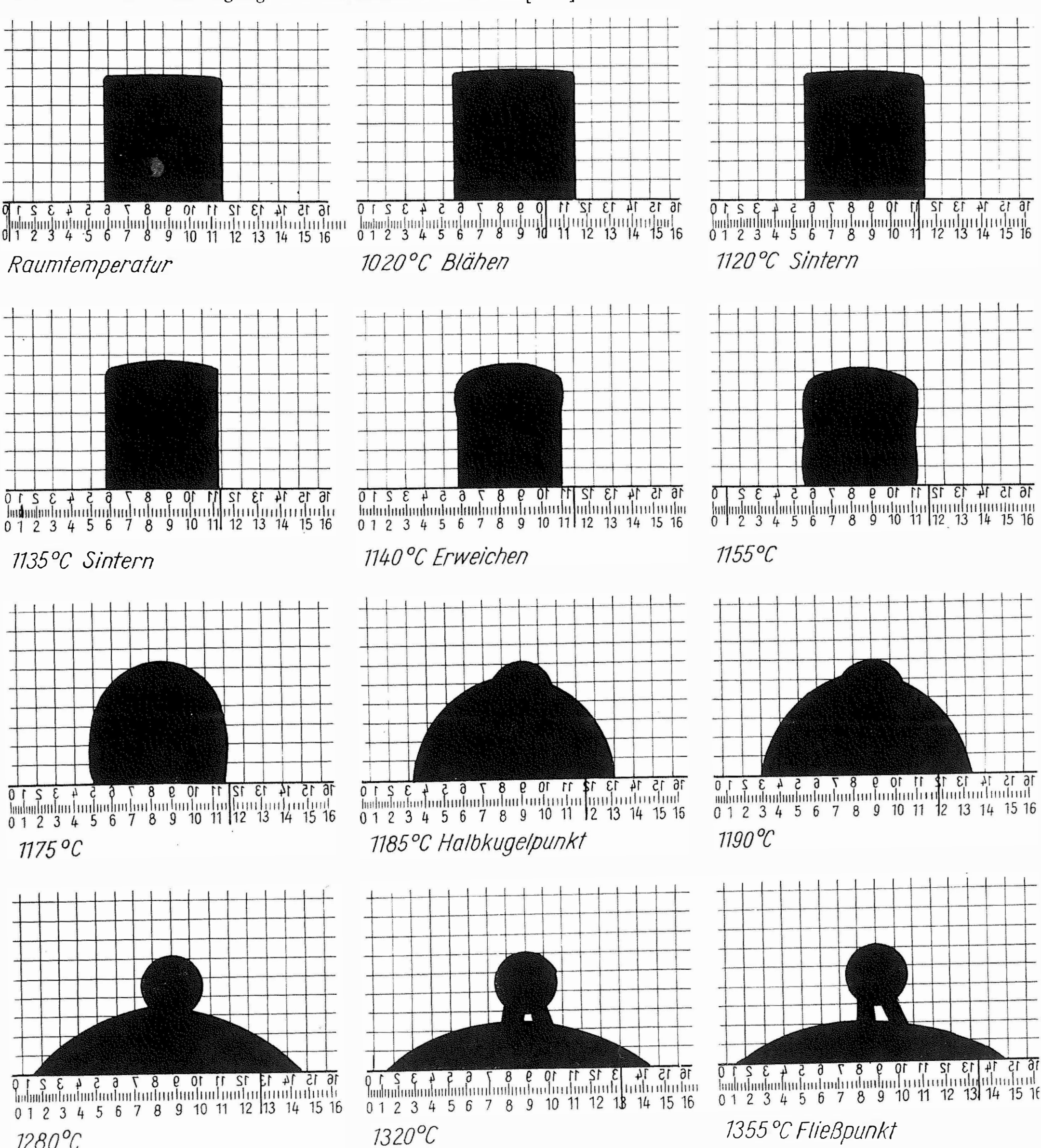
Fließpunkt

Temperatur, bei der der schmelzende Körper auf $\frac{1}{3}$ der ursprünglichen Höhe zusammengeschmolzen ist.

Andere, ebenso definierte Begriffe, auf die nicht näher eingegangen werden kann, betreffen den Schwindungs-, Erweichungs- und Schmelzbereich sowie den Randwinkel zwischen Probe und Unterlage [692] [746] [763]. Im Bild 10.32 wird als Beispiel das fast modellmäßige Schmelzverhalten an einer Braunkohlenasche demonstriert. Selbstverständlich verlaufen keineswegs alle Schmelzvorgänge in natura so eindeutig.

An Kohleproben nimmt man auch Untersuchun-

Bild 10.32. Schmelzvorgang an einer Braunkohlenasche [738]



gen vor, die Aufschlüsse über das *Verbrennungs-* und *Blähverhalten* geben [755]. Deren Bedeutung mag man daran erkennen, daß es z.B. Kohlensorten gibt, die durch Gasabgabe bei nur 100 K Temperaturerhöhung eine Volumenzunahme um etwa $\frac{1}{3}$ des Anfangswerts erfahren!

Außer der nach standardisierten Prüfverfahren vorzunehmenden Bestimmung des Schwindungs- und Dehnungsverhaltens keramischer Rohstoffe interessiert auch deren *Benetzungsverhalten* gegenüber Schlacken, Schmelzen und Chemikalien. Je kleiner der Randwinkel – das ist der am Schattenbild im Berührungspunkt Schmelze–Unterlage meßbare Winkel der Probenoberfläche gegen die Unterlage (in Richtung zur Probe gemessen) – wird, desto größer ist die Gefahr einer Reaktion zwischen Objekt und Unterlage [692] [746].

Die *Feuerfestigkeit keramischer Baustoffe* gegenüber Flußmitteln und Schlacken ermittelt man durch Herstellung von Proben aus Gemischen des keramischen Rohstoffs mit dem betreffenden Flußmittel bzw. der jeweiligen Schlacke. Deren Erweichungspunkt, den man als Maß für die Feuerfestigkeit ansehen kann, bestimmt man dann im Hochtemperaturmikroskop. In wie starkem Maße dabei die Feuerfestigkeit abnehmen kann, wird im Bild 10.33 gezeigt. So bewirkt eine Beimengung von 30% MnO zu einer Schamotte eine Erniedrigung des Erweichungspunkts um etwa 500 K! Ein weiteres Einsatzgebiet des Hochtemperaturmikroskops in diesem Industriezweig ist die Bestimmung des Schmelzverhaltens der in Brennöfen als Temperaturindikatoren dienenden Segerkegelmassen [692].

Nur kurz soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß man auch bestrebt war, *Zustandsdiagramme* metallischer und anderer Systeme hochtemperaturmikroskopisch zu untersuchen [692]. Dem lag der Gedanke zugrunde, Korrelationen zwischen Erweichungspunkt und Soliduskurve sowie Halbkugel- oder Fließpunkt und Liquiduskurve zu finden. Man erhielt technisch verwertbare Resultate. Es war aber auch zu erkennen, daß die integralen Aussagen in manchen Fällen nicht den erforderlichen Voraussetzungen an die Genauigkeit solcher Studien genügen.

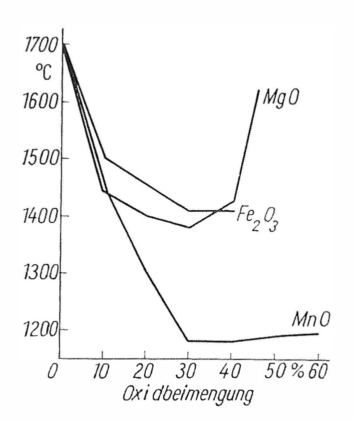


Bild 10.33. Wirkung verschiedener Flußmittel auf die Feuerfestigkeit (Erweichungspunkt) einer reinen Schamotte mit 30% Al_2O_3 [692]

Auch eine weitere Anwendung der Hochtemperaturmikroskope horizontaler Bauart soll hier nur kurz gestreift werden. Für die Verhüttung von Erzen, den Einsatz keramischer Baustoffe und die Verwendung fester Brennstoffe ist deren thermisches Verhalten unter Druckbelastung von erheblichem Interesse. Zu diesem Zweck wurde von der Firma E. Leitz, Wetzlar, ein Zusatzofen für die *Untersuchung des Druckerweichungsverhaltens* zum Erhitzungsmikroskop entwickelt [701].

Durch Hinzunahme weiterer Bauelemente lassen sich Hochtemperaturmikroskope des vorliegenden Typs auch für quantitative *polarisationsoptische Untersuchungen* ausrüsten [684]. Dabei interessiert die Änderung des Verhaltens durchsichtiger, kristalliner Stoffe im polarisierten Licht, die häufig Struktur- und Modifikationsänderungen ankündigt. Die Aufklärung von Entglasungserscheinungen durch Kristallisation und Untersuchungen des Spannungsverhaltens von Glas–Glas- oder Glas–Metall-Verbindungen sind weitere Einsatzmöglichkeiten so ausgeführter Hochtemperaturmikroskope. Beispiele für diese Gerätegruppe sind die Ausstattungen IIA-P und III-P des Erhitzungsmikroskops von E. Leitz, Wetzlar, (Bild 10.34).

Man erkennt auch hier die Aufgliederung Durchlichtleuchte – Horizontalofen – Betrachtungsmikroskop mit Einrichtung für fotografische Registrierung. Zusätzlich sind jedoch die synchrone Drehung von Polarisator und Analysator sowie die Verwendung von Kompensatoren (Berek-Kompensator 0 bis 4λ, Sénarmont-Methode 0 bis 1λ), wobei im Bildfeld neben der Temperaturanzeige auch die Stellungen von Kompensator und Analysator abgelesen werden können. Der im Bild 10.34 sichtbare Ofen mit erweitertem Ofenraum gestattet die spannungsoptische Untersuchung auch größerer Ein- und Verschmelzungen; die Maximaltemperatur des Ofens beträgt 800°C.

Für glasherstellende und -verarbeitende Betriebe ist ein hochtemperaturmikroskopisches Untersuchungsverfahren einsetzbar, das Rückschlüsse

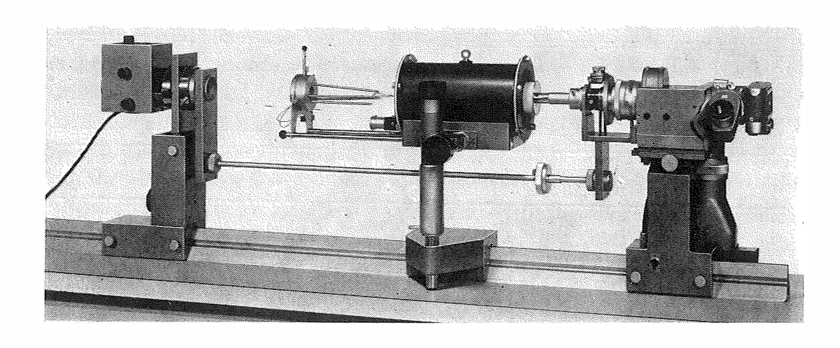


Bild 10.34
Erhitzungsmikroskop, Ausstattung III-P
Firma E. Leitz, Wetzlar, Werkfoto

auf die Viskosität und damit die optimalen Verarbeitungsbedingungen von Gläsern zuläßt. Zu diesem Zweck wurde der Begriff Zähigkeitstemperatur geprägt, womit man die Temperatur bezeichnet, bei der sich ein belasteter, unter definierten Bedingungen erwärmter Glasfaden um 1 mm/min längt.
Im VEB Carl Zeiss JENA wurde hierzu nach Vorstellungen von *Rothe* [751] ein Ofen zur *Bestimmung der Zähigkeitstemperatur* T_{z1} (Belastung 1 p/mm^2 $\approx$ 10mN/mm^2) zum Hochtemperaturmikroskop MHO2 entwickelt.
Zur Erforschung des Schmelzvorgangs an Gläsern wurde das Hochtemperaturmikroskop von *Buss* et. al. benutzt [770].
Wesentlichen Einfluß auf das Ergebnis hochtemperaturmikroskopischer Untersuchungen haben die jeweiligen Arbeitsbedingungen, z.B. die Ofenraum-Gassphäre, weil die in der Probe vor sich gehenden Reaktionen unterschiedlich ablaufen, je nachdem, ob sich diese in oxydierender, reduzierender oder inerter Gassphäre befindet. Weiterhin sind Aufheiz- und Abkühlungsgeschwindigkeit des Ofens von Einfluß auf die Resultate, weil hiervon u.U. die Gleichgewichtseinstellung im Objekt bei langsam ablaufenden Prozessen abhängt. So sollte man stets quasistationäre Verhältnisse im Ofenraum anstreben, wobei die erforderliche Zeit maßgeblich von der Viskosität des schmelzflüssigen Probenmaterials begrenzt wird. Auch Probengröße und -masse können (z.B. bei Randwinkelmessungen) die Resultate der Untersuchungen ändern. Preßt man die Probekörper aus pulverförmigem Material, so ist auch von dessen Körnung ein Einfluß zu erwarten, weil hiervon die Größe der reaktionsfähigen Grenzflächen abhängt [692].
Zum Abschluß dieses Abschnitts soll noch auf ein Gerät hingewiesen werden, das von der Formgebung der bisher angeführten Hochtemperaturmikroskope abweicht. Es handelt sich um das Griffin-Telin-Heiztischmikroskop (Griffin & George, Großbritannien), das die Kombination eines waagerecht montierten, petrologischen Mikroskops mit einer auf dem Objekttisch aufgesetzten Heizzelle ist. Das in dieser angeordnete Thermoelement dient gleichzeitig als Probenauflage, Heizelement und Meßfühler. Das Gerät wurde bisher für die Untersuchung keramischer Stoffe und Schlacken eingesetzt; die erzielbare Maximaltemperatur beträgt 1800 °C. Die förderliche Vergrößerung erreicht Werte bis 170 ×. Das Arbeiten im polarisierten Licht ist möglich; auch kann man die Heizzelle mit Schutzgas spülen [694].

10.2. Mikroskopie bei Über- und Unterdruck sowie in spezieller Gassphäre

Bereits in den Abschnitten 10.1.3.2., 10.1.3.3. und 10.1.3.4. wurden hochtemperaturmikroskopische Einrichtungen besprochen, in denen man mit Unterdruck bis etwa $1 \cdot 10^{-5}$ Torr ($= 1$ mPa) oder in Schutzgassphäre arbeitet. Auf diese Weise soll der Sauerstoffpartialdruck im Kammerinnern reduziert werden, um der hohen Affinität erhitzter, mikroskopischer Objekte zum Sauerstoff zu begegnen, die die Beobachtung ablaufender Prozesse durch Oxidbildung beeinträchtigt oder gar verhindert. Sauerstoffpartialdrücke von 10^{-4} bis 10^{-5} Torr (10 bis 1mPa) führen zwar auch zu dünnen Oxidschichten, die aber im allgemeinen noch nicht stören, wenn man von einigen Ausnahmen (Aluminium, Titan, Uran, Zirkon) absieht. Bei Untersuchungen an solchen Stoffen muß man Ultrahochvakuum (10^{-8} bis 10^{-9} Torr $= 1$ bis $0{,}1$ μPa) oder weitgehend sauerstofffreie Schutzgase benutzen. Im Feinvakuumbereich arbeitende Zusätze zu Heizkammern für die chemische Mikroskopie erleichtern das Studium von Sublimationsprozessen.

Untersuchungen in *Überdruckkammern zu Mikroskopen* werden dann erforderlich, wenn leichtflüchtige oder unter Normaldruck zersetzliche Substanzen als Proben vorliegen.
Dies können z.B. Metalle sein, die bei hohen Temperaturen zu starker Verdampfung neigen (Molybdän; Legierungsbestandteile, die selektiv abdampfen), oder auch zersetzliche, organische Verbindungen. Aus diesem Grund sind einige Hochtemperaturkammern (VACUTHERM, IMASCH-Serie) für das Arbeiten mit Überdruck ausgelegt. *Joebstl* und *Dix* [708] setzten eine Hochdruckkammer (maximal 100 kbar) ein, um die Polymorphie von Aziden sowie deren Kornwachstum und Zersetzung bis 250°C zu verfolgen. *Heymer*, *Niegel* und *Schneider* [699] benutzten eine Tieftemperatur-Überdruckkammer (Grenzwerte $-40\,°C$; $25\ kp/cm^2 \approx 2{,}5\ N/mm^2$), um Paraffinkristallstrukturen bei der Entparaffinierung von Schmierölen mit Flüssigpropan studieren zu können. Die Konstruktion derartiger Kammern unterscheidet sich von der üblicher Hoch- und Tieftemperaturkammern im wesentlichen nur durch die Gewährleistung der erforderlichen Belastbarkeit; neue Gesichtspunkte treten hierbei nicht auf.
Nicht ganz so eng wie bei den Unter- und Überdruckkammern ist bei den *Einrichtungen für die Mikroskopie in spezieller Gassphäre* die Bindung an die Hoch- und Tieftemperaturtechnik.
So gibt es z.B. in der Biologie Probleme, die die Beeinflussung der Lebensfunktionen von Kleinlebewesen bei normaler Umgebungstemperatur in bestimmter Gassphäre enthalten. Von Interesse ist ferner der Ablauf chemischer Reaktionen unter speziellen Bedingungen an die Umgebungs-Gassphäre. Man arbeitet dann meist in Klimaschränken (s. Abschnitte 10.1.3.1. und 10.3.), die die gesamte mikroskopische Einrichtung (außer dem Einblicktubus, der fotografischen Einrichtung und den Bedienelementen der Mikroskopmechanik) aufnehmen und in denen außer der Gassphäre die Luftfeuchtigkeit und zuweilen auch die Temperatur geregelt werden können. Über solche Untersuchungen an sauerstoff- und feuchtigkeitsempfindlichen oder giftigen bzw. giftige Dämpfe absondernden Stoffen berichteten *Crisler*, *Hecht-Crisler* und *Brinkman* [665] [666].
Das Verhalten nichtbeständiger, anorganischer Salze studierten *Emons*, *Hahne* und *Seyfarth* in einer kombinierten Präparier-Mikroskopierbox [683].
Die Wirkung der Gassphäre auf die mikroskopischen Objekte bei Glasschmelzprozessen untersuchten *Conroy* und *Robertson* [664] in einer Hochtemperaturkammer. In einer ähnlichen Einrichtung setzte *Hasson* [697] Metalloberflächen der korrodierenden Wirkung gasförmiger, ätzender Stoffe aus und versuchte so, Werkstofffragen zu lösen, die in kernphysikalischen Anlagen auftreten.

10.3. Mikroskopie unter besonderen Bedingungen hinsichtlich Luftfeuchtigkeit

Die Mehrzahl mikroskopischer Objekte bei Untersuchungen in Biologie und Medizin stellt Forderungen hinsichtlich des Feuchtigkeitsgehalts der sie umgebenden Gassphäre. Einerseits handelt es sich dabei um Individuen, die nur im Wasser existieren können; und um die beim Arbeiten unter dem Mikroskop meist geringen Flüssigkeitsmengen vor dem Verdunsten zu bewahren, muß die sie umgebende Luft in starkem Maße mit Feuchtigkeit angereichert sein. Zum anderen ist hohe Luftfeuchtigkeit auch bei solchen Präparaten (Gewebeexplantate, Bakterien- und Pilzkulturen) vonnöten, die ihre Lebensfähigkeit nur dann behalten, wenn sie vor dem Austrocknen geschützt werden. In den meisten Fällen kann man dies durch die Benutzung von *Feuchtkammern* erzielen.
Diese haben ein flaches Gehäuse aus Metall, Glas oder Kunststoff. Die im mikroskopischen Strahlengang liegenden Teile bestehen aus Glas. Durch Anbringen auffüllbarer Wasserrinnen [741], Einlegen von flüssigkeitsgetränktem Zellstoff oder poröser Keramikteile, die man während der Versuche durch Auftropfen von Wasser tränkt, erreicht man die erforderliche Luftfeuchtigkeit im Kammerinnern. Feuchtkammern befestigt man am bewegbaren Objekttisch oder koppelt sie mit einem Objektführer. Zum Einführen der für die Mikromanipulation erforderlichen Werkzeuge sind spezielle Muffen und Schlauchdichtungen vorgesehen.
Für Präparate, die neben der Forderung an eine hohe Luftfeuchtigkeit noch weitere an die Temperatur verbinden, kann man die Bauprinzipien von Feuchtkammern mit denen der im Abschn. 10.1.3.1. beschriebenen Temperiereinrichtungen vereinigen.
Solche Kammern, die mit elektrischer Widerstandsheizung (Bild 10.4 b und c) oder nach Art der Durchflußküvetten (Bild 10.5) arbeiten, sind seit Jahrzehnten bekannt [744].

Ein anderer Weg, die geforderte hohe Luftfeuchtigkeit und (zusätzlich) gewünschte Temperaturen beim Mikroskopieren zu erreichen, führt zu *Klimaschränken*, die im Aufbau den im Abschnitt 10.1.3.1. beschriebenen Wärmeschränken (Bild 10.12) gleichen. Dies ist z. B. bei der mikrokinematografischen Registrierung von Wachstumsprozessen und anderen Vorgängen an Kulturen auf Nährböden von Bedeutung, weil man über einen längeren Zeitraum mit Zeitraffung arbeitet und jede Änderung der Luftfeuchtigkeit Quellung oder Schrumpfung des Nährbodens und damit Unschärfe im mikroskopischen Bild nach sich zieht.

Klimaschränke benutzt man auch dann, wenn Untersuchungen in trockener Atmosphäre erforderlich sind, z. B. in der chemischen Mikroskopie beim Vorliegen hygroskopischer oder feuchtigkeitsempfindlicher Substanzen. Man entzieht der Atmosphäre die Feuchtigkeit durch Trockenmittel oder Molekularsiebe.

Vielfach sind solche Einrichtungen auch für das Arbeiten in gewünschter Gassphäre verwendbar (s. Abschn. 10.2.).

11. Ausblick auf die zukünftige Entwicklung der Lichtmikroskopie

von Dr. rer. nat. *Hermann Beyer* und Dipl.-Phys. *Bernhard Gröbler*

Das Lichtmikroskop hat im Verlauf seiner fast 400jährigen Geschichte einen beachtlichen Leistungsstand erreicht, doch ein Abschluß seiner Entwicklung ist heute noch nicht abzusehen. Das Entwicklungstempo war in den verschiedenen Etappen sehr unterschiedlich. Nach der Erfindung des Mikroskops folgte ein Jahrhundert der ersten bedeutenden Erfolge einzelner Mikroskopiker, dem sich ein Jahrhundert der Stagnation anschloß, bis man gelernt hatte, achromatische Linsensysteme herzustellen. Ein gewisser Abschluß wurde durch die Schaffung der homogenen Immersion und der Apochromate erreicht. Etwa 50 Jahre später wurden der Mikroskopie lebender Präparate durch das Phasenkontrastverfahren neue Perspektiven eröffnet.
Man kann wohl mit ziemlicher Sicherheit annehmen, daß die visuelle mikroskopische Beobachtung auch in 100 bis 200 Jahren noch ihre Existenzberechtigung haben wird. Das gilt besonders für die belebte Natur; denn der Blick in die Werkstatt des Lebens kann niemals vollständig durch Meßdaten und ihre Auswertung in einem Elektronenrechner ersetzt werden. Allerdings ist anzunehmen, daß in verstärktem Maße der Einblick ins Okular vom Bildschirm abgelöst wird, auf dem das mikroskopische Bild genügend stark vergrößert erscheint.
Obwohl das Messen, Zählen und Vergleichen schon frühzeitig in die mikroskopische Praxis eingeführt worden ist, handelte es sich doch überwiegend um qualitative mikroskopische Untersuchungen, um aus Form und Anzahl bestimmter Objekte und Objektstrukturen auf die Eigenschaften der organischen und anorganischen Materie zu schließen. Erst allmählich hat die quantitative Mikroskopie immer stärker an Bedeutung gewonnen und drängt heute nach ständiger Erweiterung und Vervollkommnung.
Zunächst war es die Polarisationsmikroskopie, die sich bei der Untersuchung doppelbrechenden Materials im polarisierten Licht genauer Gangunterschiedsmessungen bediente. Später wurden im Bereich der Interferenzmikroskopie und der Mikroskopfotometrie an mikroskopischen Objekten Dicken, Brechzahlen und Absorptionen gemessen. Die Abhängigkeit der Absorption von der Wellenlänge führte zur Mikrospektralfotometrie.
Da im Verlauf der technisch-wissenschaftlichen Entwicklung die Menge des zu untersuchenden Materials stark angewachsen ist und in vielen Fällen vom gleichen Material stets eine größere Anzahl Proben untersucht werden müssen, um zu gesicherten statistischen Aussagen zu gelangen, wird eine stärkere Mechanisierung und Automatisierung, vor allem der quantitativen mikroskopischen Untersuchungen, nicht nur wünschenswert, sondern in Zukunft zu einer unabdingbaren Forderung. Diese wird noch durch die Tatsache erhärtet, daß es in den meisten Fällen nicht genügt, nur einen Parameter, etwa die Größe bzw. Größenverteilung bestimmter mikroskopischer Bildelemente, wie biologische Zellen oder Zellkerne im Dünnschnitt oder Ausstrich, zu bestimmen. Zur Gewinnung einer sicheren Aussage sind vielfach verschiedene Parameter, z. B. Größe, Form, Häufigkeit, Orientierung, Brechzahl, Reflexionsvermögen und Durchlässigkeit, miteinander zu kombinieren. Es werden z. Z. große Anstrengungen gemacht, um z. B. durch Kombination der aus der Vermessung von Einzelzellen erhaltenen Parameter eine Früherkennung des Krebses zu ermöglichen. Die dafür erforderlichen Messungen sowie die sinnvolle Weiterverarbeitung der gewonnenen Meßwerte sind zwar nach den bisher üblichen Methoden prinzipiell möglich, doch, vor allem wegen des zu hohen Zeitaufwands, praktisch nicht durchführbar.
Schon heute sind einige Ansatzpunkte vorhanden, um mikroskopische Untersuchungen dieser Art immer stärker zu mechanisieren und zu automatisieren. Es werden vor allem geometrische, interferometrische oder fotometrische Meßgrößen ermittelt und anschließend nach einem vorbestimmten Programm in einer Datenverarbeitungsanlage ausgewertet. Diese Datenverarbeitungsanlage kann Bestandteil des Geräts sein; dann läßt sie sich

für den speziellen Anwendungszweck relativ einfach bauen. Im anderen Fall werden die Meßgrößen auf einem geeigneten Speicher (z.B. Lochstreifen oder Magnetband) registriert, und die Auswertung erfolgt in einer der vielseitig anwendbaren elektronischen Datenverarbeitungsanlagen, wie sie mehr und mehr zur Anwendung kommen.

Die verstärkte Anwendung der modernen Elektronik wird sicher aus den vorgenannten Gründen ein wesentlicher Faktor in der zukünftigen Mikroskopentwicklung sein. Die Miniaturisierung der elektronischen Bauelemente und Schaltungen, z.B. in Form der Mikroelektronik, wird andererseits eine stärkere Anwendung des Mikroskops in dieser Arbeitsrichtung erfordern.

In der Perspektive wird auch die Mikroskopie unter Verwendung besonderer Strahlenarten, sei es im sichtbaren oder unsichtbaren Spektralbereich, weiter an Bedeutung gewinnen. Von den mikroskopischen Verfahren im unsichtbaren Spektralbereich hat sich bisher, wegen der wesentlichen Erhöhung des Auflösungsvermögens, vor allem die Elektronenmikroskopie in stärkerem Maße durchsetzen können. Durch die sehr kurze Wellenlänge der verwendeten Elektronenstrahlen kann das Auflösungsvermögen etwa auf das 100fache gegenüber dem Lichtmikroskop gesteigert werden. Doch muß man, wegen der Absorption der Elektronen in der Atmosphäre, stets im Hochvakuum arbeiten. Die Untersuchung lebender Objekte ist kaum möglich. Das sind die wesentlichen Gründe, weshalb die Lichtmikroskopie kaum jemals von der Elektronenmikroskopie verdrängt werden kann. Innerhalb des vom Lichtmikroskop erreichbaren Auflösungsvermögens ist es dem Elektronenmikroskop eindeutig überlegen.

Die Mikroskopie mit Strahlenarten, die sich an den sichtbaren Spektralbereich anschließen, d.h. im ultravioletten und infraroten Spektralbereich, kann für Substanzuntersuchungen an organischer und anorganischer Materie große Bedeutung erlangen. Die wesentlichen optischen Elemente zur Realisierung der Mikroskopie in diesen Spektralbereichen sind schon entwickelt worden. Auch Untersuchungen dieser Art, besonders in der Zytologie mit ultraviolettem Licht, sind, wie bereits aus Abschn. 6.1.6. hervorgeht, schon über Jahrzehnte durchgeführt worden. Die IR-Mikroskopie wird mit der Weiterentwicklung der Halbleitertechnik an Bedeutung gewinnen, weil viele Halbleiter im infraroten Spektralbereich durchlässig sind. Das gilt neben verschiedenen Mineralien auch für andere technische Kunstprodukte, wie Kunstfasern u.dgl. Wegen der damit verbundenen Vorteile wird man in vielen Fällen die mit der größeren Wellenlänge verbundene verminderte Auflösung in Kauf nehmen.

Auch die Röntgenstrahlung ist schon zur Verwendung in der Mikroskopie vorgeschlagen und auch in einigen Fällen dafür nutzbar gemacht worden. Sie kann ebenfalls viele Substanzen fast ungehindert durchdringen. Da ihre Wellenlänge wesentlich kleiner als die der sichtbaren Strahlung ist, läßt ihre Anwendung eine wesentlich höhere Auflösung erwarten. Die Röntgenstrahlen werden im Gegensatz zu den Elektronenstrahlen in der Atmosphäre nicht oder kaum absorbiert. Hochvakuum ist also im Objektraum nicht erforderlich. Leider lassen sich Röntgenstrahlen nur sehr schwierig aus ihrer Richtung ablenken, also auch schwierig fokussieren. Aus diesem Grund ist bisher nur die Röntgenschattenmikroskopie praktisch durchgeführt worden. Eine Feinfokusröntgenröhre wird in der Nähe des zu untersuchenden Präparats angeordnet und letzteres von dem divergierenden Röntgenstrahlenbündel durchstrahlt, so daß auf einem Fluoreszenzschirm ein Röntgenschattenbild sichtbar gemacht werden kann. Die Auflösung des Lichtmikroskops wird dabei allerdings nicht erreicht. Es existieren bis jetzt noch keine abbildenden Systeme, deren Qualität auch nur annähernd als für die Röntgenmikroskopie ausreichend angesehen werden kann. Es läßt sich über die Perspektive der Röntgenmikroskopie nur schwer eine Prognose stellen.

Zu den vorher erwähnten besonderen Strahlenarten gehört auch die Laserstrahlung, die sich durch besonders gute zeitliche und räumliche Kohärenz auszeichnet. Sie wird sicher noch eine besondere Bedeutung für die Mikroskopie, z.B. im Rahmen der Holografie, erlangen.

Unter Holografie [774] versteht man ein neuartiges Bildaufzeichnungsverfahren, bei dem kohärentes (Laser-) Licht benutzt wird und das ohne Linsenoptik arbeitet. Kurz gesagt, basiert es auf der Erzeugung von Zweistrahlinterferenzen zwischen den vom Gegenstand beeinflußten Lichtwellen und einer Referenzwelle. Die fotografische Aufnahme dieses Interferenzmusters ist das Hologramm. Bei erneuter Durchstrahlung des Hologramms mit kohärentem Licht entsteht durch Beugung ein Bild des Gegenstands. Dieses Bild hat alle räumlichen und perspektivischen Eigenschaften, die beim normalen Betrachten des Gegenstands vom Ort des Hologramms aus wahrnehmbar sind. Je nach Wahl der geometrischen

Anordnung bei Aufnahme und Reproduktion des Hologramms kann man beliebige Abbildungsmaßstäbe erhalten. Dieses und andere Verfahren der sog. kohärenten Optik eröffnen unabsehbare Möglichkeiten für das optische Instrumentarium der Zukunft.
Zur Zeit finden diese Verfahren in der Mikroskopie jedoch nur zögernd Eingang [773]. Es werden vor allem zwei Aspekte der Holografie stark beachtet.

1. Eine holografische Abbildung im Maßstab 1 : 1 ist aberrationsfrei und läßt sehr große Dingfelder zu, bei numerischen Aperturen bis nahe an Eins. Dies wird in der Kopiertechnologie für Mikroschaltkreise genutzt, wobei ziemlich große Flächen mit hoher Auflösung abzubilden sind.
2. Ein Hologramm speichert ein scharfes Bild vom gesamten Raum. Schnell bewegte Objekte, z.B. Pantoffeltierchen, kann man unter normalen Umständen nicht fotografieren, weil sie nicht in der Einstellebene der fotografischen Einrichtung bleiben. Stellt man jedoch von dem Raumgebiet, in dem sich die Objekte aufhalten, ein Momenthologramm (Impulslaser) her, so kann man bei der Reproduktion in Ruhe ein stehendes Bild des Raums durchmustern und die Objekte finden. Auf diese Weise wurden natürliche Nebel, Sprays, Hydrosole u.ä. erfolgreich untersucht [775].

Wie schon im Abschn. 1. anhand der historischen Entwicklung gezeigt werden konnte, sind der Mikroskopie, sowohl durch Forderungen der Praxis als auch aufgrund vertiefter theoretischer Erkenntnisse und erweiterter technischer Möglichkeiten, mehrfach neue, erweiterte Perspektiven eröffnet worden.
Außer den in diesem Abschnitt schon erwähnten Möglichkeiten ist zu erwarten, daß im Verlauf der Weiterentwicklung von Wissenschaft und Technik, besonders der Entdeckung neuer physikalischer Effekte, auch der Mikroskopie weitere Impulse zu ihrer Vervollkommnung und Erweiterung ihres Anwendungsbereiches geliefert werden.

Literaturverzeichnis

Literatur zu Abschnitt 1.

[1] *Berg, A.:* Die Bedeutung der Mikroskopie für die Entwicklung der Biologie und Medizin. In: *E.Leitz:* Optische Werke 1849–1949. Frankfurt: Umschau-Verlag 1949.

[2] *Berg, A.*; *Freund, H.:* Die Entwicklung der mikroskopischen Forschung im Überblick. In: *H.Freund:* Geschichte der Mikroskopie. Bd.1. Frankfurt: Umschau-Verlag 1963.

[3] *Beyer, H.:* 100 Jahre ABBEsche Mikroskoptheorie und ihre Bedeutung für die praktische Mikroskopie. Jenaer Rdsch. 18 (1973) S.159 bis 163; Feingerätetechnik 22 (1973) S.147–150.

[4] *Boegehold, H.:* Die geschichtliche Entwicklung des *Mikroskops.* In: *Czapski-Eppenstein:* Grundzüge der optischen Instrumente. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1924.

[5] *Hintzsche, E.:* Das Mikroskop. Ciba Zeitschrift 10 (1949).

[6] *Hooke, R.:* Micrographia. London: Royal Society 1665. Nachdruck 1961.

[7] *Rooseboom, M.:* Microscopium. Leiden: National Museum for the History of Science 1956.

[8] *Weise, K.:* Light (optical) Microscopy, Origin and History. In: *G.L.Clark:* The Encyclopedia of Microscopy. New York, London 1961.

Literatur zu Abschnitt 2.

[9] *Abbe, E.:* Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *M.Schultzes* Archiv f. mikr. Anat. 9 (1873) S.413. Ges. Abh. I (1904) S.45.

[10] – Über Stephensons System der homogenen Immersion bei Mikroskop-Objektiven. Sitzb. Jen. Med. Naturw. (1897) S.3–16. Ges. Abh. I (1904) S.181.

[11] – Über neue Mikroskope. Über Verbesserung des Mikroskops mit Hilfe neuer Arten optischen Glases. Sitzb. Jen. Med. Naturw. (1886) S.107.

[12] *Benford, J.R.:* Microscope Objectives in Applied Optics and Optical Engineering. Ed. by Kingslake, Vol. III. New York, London: Academic Press 1965.

[13] *Berek, M.:* Grundlagen der Tiefenwahrnehmung im Mikroskop. Sitzb. Ges. Fördg. d. ges. Naturw. Marburg 62 (1927) S.189.

[14] *Boegehold, H.:* Die Verbesserung des Bildfeldes der Mikroskopobjektive (Planachromate). Z. wiss. Mikr. 55 (1938) S.17.

[15] – Das Bildfeld des Mikroskops. Jenaer Jb. (1950) S.19.

[16] – Neue Mikroskopobjektive und -okulare. Feingerätetechnik 1 (1952) S.114

[17] – Das optische System des Mikroskops. Berlin: VEB Verlag Technik 1958.

[18] –, u. *Köhler, A.:* Das Homal, ein System, welches das mikrophotographische Bild ebnet. Z. wiss. Mikr. 39 (1922) S.249.

[19] *Claussen, H.C.:* Microscope Objectives with Plano-Correction. Applied Optics 3 (1964) S.993. Mikroskop-Objektive mit geebnetem Feld. Leitz-Mitt. IV (1967) S.65.

[20] *Focke, J.:* Der Einfluß des Öffnungsfehlers auf die Bildgüte. Optica Acta 4 (1957) S.17

[21] *Grey, D.S.:* A new series of microscope objectives: II Preliminary investigation of catadioptric. Schwarzschildsystems. J.O.S.A. 39 (1949) S.723.

[22] – III. Ultraviolet objectives of intermediate numerical aperture. J.O.S.A. 40 (1950) S.283.

[23] – A family of catadioptric microscope objectives. Proc. of the London Conference on Optical Instr. 1950, S.65.

[24] *Hopkins, H.H.:* The Frequency Response of Optical Systems. Proc. Phys. Soc., Sect. B 69 (1956) S.562.

[25] *Ignatowsky, W.v.:* Zur Geschichte des Kardioidkondensors. Z. wiss. Mikr. 28 (1911) S.52.

[26) *Jahnke-Emde:* Tafeln höherer Funktionen. 4.Aufl. Leipzig: BSB B.G.Teubner Verlagsgesellschaft 1948.

[27] *Jenkins, F.A.; White, H.E.:* Fundamentals of Optics. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company, Inc. 1957.

[28] *Köhler, A.; Rohr, M.v.:* Eine mikrophotographische Einrichtung für ultraviolettes Licht. Z. Instrkde. 24 (1904) S.341.

[29] *Linfoot, E.H.:* Fourier Methods in Optical Image Evaluation. London, New York: Focal Press 1964.

[30] *Michel, K.:* Die Grundlagen der Theorie des Mikroskops. Stuttgart: Wiss. Verlagsges. 1950.

[31] *Moenke, H.* u. *L.:* Einführung in die Laser-Mikro-Emissionsspektralanalyse. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest & Portig K.-G. 1968.

[32] *Mütze, K.; Foitzik, L.; Krug, W.; Schreiber, G.:* ABC der Optik. Leipzig: VEB F.A.Brockhaus Verlag 1961.
[33] *Norris, K.P.:* Development of reflecting microscopes. Research 8 (1955) S.94.
[34] –, u. *Wilkins, M.H.F.:* A reflecting microscope of 1,3 numerical aperture. Disc. of the Farad. Soc. 9 (1950) S.360.
[35] *Ramsthaler, P.:* Über Planachromate. Mikroskopie 2 (1947) S.55.
[36] – Über Mikroskopobjektive mit ebenem Bildfeld. Schweiz. Zeitschr. f. Opt. u. Mech. 24 (1948) S.12.
[37] *Riesenberg, H.:* Das Spiegelmikroskop und seine Anwendungen. Jenaer Jb. (1956) S.30.
[38] – Über eine Gruppe von Mikroskop-Spiegelobjektiven mit Zentralabschattungen verschiedener Größe. Optik aller Wellenlängen. Berlin: Akademie-Verlag GmbH 1959.
[39] – Über den optischen Korrektionszustand eines monochromatischen UV-Objektivs bei verschiedenen Wellenlängen. Exp. Technik d. Phys. X (1962) S.114.
[40] – Ein neues Mikroskop-Spiegelobjektiv mit großem Arbeitsabstand. Jenaer Rdsch., Messesonderheft (1964) S.40.
[41] – Ein nicht-rotationssymmetrisches Zweispiegelsystem mit korrigierter Bildfeldneigung. Jenaer Jb. (1965) S.15.
[42] – Die Weiterentwicklung der Abbeschen Erkenntnisse in der Optikentwicklung moderner Mikroskope. Feingerätetechnik 22 (1973) S.163 bis 167.
[43] *Setterington, R.:* The specification of a standard Microscope cover-class. J. Roy. Micr. Soc. Ser. III 73 (1953) S.69.
[44] *Siedentopf, H.:* Die Vorgeschichte der Spiegelkondensoren. Z. wiss. Mikr. 24 (1907) S.382.
[45] *Skworzow, G.E.; Panow, W.A.; Poljakow, N.I.; Fedin, L.A.:* Mikroskopie. Leningrad 1969.
[46] *Slevogt, H.:* Zur Beurteilung der Bildgüte nach Definitionshelligkeit oder λ/4-Kriterium. Optica Acta 1 (1954/55) S.21.
[47] *Strehl, K.; Picht, J.:* Wellenoptische Studie eines Mikroskopobjektivs. Z. Instrkde. 52 (1932) S.299.
[48] Taschenbuch Feingerätetechnik, Bd. I. Berlin: VEB Verlag Technik 1968.

Literatur zu Abschnitt 3.

[49] *Lau, E.:* Das Doppelmikroskop und Beispiele seiner Anwendung. Feingerätetechnik 9 (1960) S.112.
[50] *Lummer, O.; Reiche, F.:* Die Lehre von der Bildentstehung im Mikroskop. Braunschweig: Vieweg Verlag 1910.
[51] *Tappert, J.:* Die Bildentstehung im Mikroskop. Wissenschaft und Fortschritt 7 (1957) S 361.

Literatur zu Abschnitt 6.1.1.

[52] *Grabner, A.:* Objektiv, Okular und Auge eine Bilanz ihres Zusammenspielens beim Mikroskopieren. Mikroskopie 10 (1955), S 83.
[53] *Köhler, A.:* Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke. Z. wiss. Mikr. 10 (1893) S.433.

Literatur zu Abschnitt 6.1.2.

[54] *Albertini, A.v.:* Zur Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der pathologischen Histologie. Schweiz. Zeitschr. Path. Bakt. 8 (1945) S.298.
[55] *Bajer, A.:* Living Smears from Endosperm. Experientia 11 (1955) S.221.
[56] – Cine Micrographic Studies of Chromosome Movements in β-Irradiated Cells. Chromosoma 9 (1958) S.319.
[57] –, *Molé-Bajer, J.:* Cine Micrographic Studies of Mitosis in Endosperm. II. Chromosome, Cytoplasmic and Brownian Movements. Chromosoma 7 (1956) S.558.
[58] *Barer, R.:* Phasecontrast-Terminology. Microscopie 7 (1952) S.410.
[59] – Phasecontrast-Microscopy. Research 8 (1955) S.341.
[60] *Bennett, A.H.; Osterberg, H.; Jupnik, H.; Richards, O.W.:* Phase-Microscopy. Principles and Applications. New York, London 1951.
[61] *Bertoldi, G.:* Phasenkontrast in der Mineralogie als Hilfsmittel bei der Brechzahlbestimmung mittels Immersionsmethode. N. Jb. Miner. 92 (1959) S.10.
[62] *Beyer, H.:* Untersuchungen über den Einfluß der Gestalt der Aperturblende auf die mikroskopische Abbildung beim Phasenkontrastverfahren. Jenaer Jb. (1953) S.162.
[63] – Farbmetrische Behandlung der Phasenkontrastabbildung bei Beleuchtung mit Mischlicht, speziell weißem Licht. Jenaer Jb. (1963) S.11.
[64] – Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest & Portig K.-G. 1965.
[65] – Zur Abbildung extrem dünnwandiger nichtabsorbierender Röhren im Lichtmikroskop. Jenaer Jb. (1966) S.173.
[66] –, *Schöppe, G.:* Die Anwendung der Farbimmersionsmethode im Phasenkontrast und Dunkelfeld bei der Untersuchung von Mineralstäuben. Jenaer Jb. (1965) S.21.
[67] *Brandstätter, M.:* Spiralabbau der Kristalle durch Verdampfung. Mikroskopie 12 (1957) S.32.
[68] *Buchsbaum, R.:* Individuel Cells Observed under Phasemicroscopy during Fixation. Anat. Rec. 99 (1947) S.640.
[69] – Individual Cells under Phase-Microscopy be-

fore and after Fixation. Anat. Rec. 102 (1948) S. 19.
[70] *Correns, C. W.:* Bestimmung der Brechungsexponenten in Gemengen feinkörniger Minerale und von Kolloiden. Fortschr. Min. Krist. Petrogr. 14 (1930) S. 26.
[71] *Crossman, B.:* Mounting media for Phase Microscope Specimens. Stain Technol. 24 (1949) S. 241.
[72] *Emmons, R. C.:* The Double Variation Method of Refractive Index Determination. Amer. Mineral. 14 (1929) S. 414.
[73] *Fawcett, D. W.; Ito, S.:* Observations on the Cytoplasmatic Membrans of Testicular Cells. Examind by Phasecontrast and Electron-Microscopy. J. Bioph. and Biochem. Cytol. 4 (1958) S. 135.
[74] *Franke, H.:* Phasenkontrasthämatologie. Stuttgart 1954.
[75] *Fröhlich, R. O.:* Phasenkontrastmikroskopie in der Medizin. Jena 1955.
[76] *Gabler, F.:* Positiver oder negativer Phasenkontrast. Mikroskopie 10 (1955) S. 119.
[77] *Girbardt, M.:* Lebendbeobachtungen an Polystictus versicolor (L). Flora 142 (1955) S. 540.
[78] – Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Polystictus versicolor. III. Änderung der Grundplasmastrukturen während der Schnallenbildung. Z. Naturforsch. 17 (1962) S. 49.
[79] – Eine Zielschnittpräparation für Pilzzellen. Mikroskopie 20 (1965) S. 254.
[80] – Lebendnachweis von Einzelelementen des endoplasmatischen Retikulums. J. Cell Biol. 27 (1965) S. 433.
[81] *Grigorovici, R.; Manaila, R.:* L'image des objekts epais dans le microscope à contraste de phase. Rev. d'Optique 37 (1958) S. 281.
[82] *Hansen, H. G.; Rominger, A.; Michel, K.:* Das Phasenkontrastverfahren in der Medizin. Göttingen 1952.
[83] *Haselmann, H.:* Beiträge zur Phasenkontrastmikroskopie. 2. Mitteilung. Strukturprobleme im Licht der Phasenkontrastmikroskopie. Mikroskopie 6 (1951) S. 9.
[84] – Das Mikroskop, Werkzeug und Objekt der Wissenschaft Z. wiss. Mikr. 67 (1966) S. 244.
[85] *Heidermanns, G.:* Zur Technik der Pulvermikroskopie mit dem Phasenkontrastmikroskop. Staub 19 (1959) S. 104.
[86] *Hirsch, Th. v.:* Histologische Schnitte im Phasenkontrastbild. Z. wiss. Mikr. 61 (1952) S. 68.
[87] – Phasenkontrastmikroskopie histologischer Schnitte. Z. wiss. Mikr. 61 (1953) S. 337.
[88] *Juda, J.; Medenbach, K.:* Untersuchung von Feinstäuben nach der λ-Variationsmethode im Phasenkontrast. Z. wiss. Mikr. 64 (1959) S. 218.
[89] *Kalk, E.:* Die Verwendung des Polarisationsmikroskops bei Phasenkontrast und allseitig gerader Dunkelfeldbeobachtung in der Bodenmineralogie. Zeiss-Mitt. 1 (1959) S. 354.
[90] *Knöll, H.:* Zur Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Bakteriologie. Zeiss-Nachr. 5 (1944) S. 38.
[91] *Köhler, A.; Loos, W.:* Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendung in der Mikroskopie. Naturwiss. 29 (1941) S. 49.
[92] *Loos, W.; Klemm, W.; Smekal, A.:* Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie auf Modellversuche zum Poliervorgang von Gläsern. Naturwiss. 29 (1941) S. 769.
[93] *Luster, E. A.:* Phase-Microscope Technique for Refractive Index Determination of Anisotropic Particles at High Magnification. Microscope 13 (1963) S. 363.
[94] *Menzel, E.:* Erhöhter Bildkontrast bei ausgedehnten Objekten. Optik 5 (1949) S. 385.
[95] *Michel, K.:* Die Kern- und Zellteilung im Zeitrafferfilm. Die meiotischen Teilungen in der Spermatogenese der Schnarrheuschrecke Psophus stridulus. Zeiss-Nachr. 4 (1943) S. 236.
[96] *Müller, R.:* Zur Verbesserung der Phasenkontrastmikroskopie durch Verwendung von Medien optimaler Brechungsindizes. Mikroskopie 11 (1956) S. 36.
[97] *Piller, H.:* Die Phasenkontrastmikroskopie als Hilfsmittel zur Bestimmung feinkörniger, speziell dünner, transparenter Minerale. Heidelberg: Beitr. Min. und Petrogr. 3 (1952) S. 307.
[98] *Reumuth, H.:* Zur Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie auf Probleme der Faserforschung und Technik. Zeiss-Nachr. 5 (1945) S. 229.
[99] *Ribbe, P. H.; Cott, H. C. van:* Unmixing in Peristerit Plagioclases Observed by Darkfield and Phasecontrast-Microscopy. Canadian-Mineralogist 7 (1962) S. 278.
[100] *Rind, H.:* Atlas der Phasenkontrasthämatologie. Berlin 1958.
[101] *Schmidt, K. G.:* Die Phasenkontrastmikroskopie in der Staubtechnik. Staub 15 (1955) S. 436.
[102] – Asbestsorten, ihre Untersuchung mit optischen Mitteln und ihre krankmachende Wirkung. Staub 20 (1960) S. 173.
[103] –, *Heidermanns, G.:* Zur Technik der Staubmikroskopie mit Phasenkontrast und Grenzdunkelfeld. Staub 18 (1958) S. 236.
[104] *Schoon, Th. G. F.:* Phasenkontrastmikroskopie natürlicher Kautschuk-Latices. Kolloid-Z. 141 (1955) S. 82.
[105] *Schuster, K.:* Zur Theorie der Abbildung eines Einzelstreifens nach dem Phasenkontrastverfahren. Jenaer Jb. (1951) S. 22.
[106] *Siering, H.:* Das Phasenkontrastverfahren in der pathologischen Histologie. Zbl. Allg. Path. u. Path. Anat. 85 (1949) S. 371.
[107] –, *Aderhold, K.:* Leitfaden der Nativzytomorphologie maligner Tumoren. Jena 1956.
[108] *Spangenberg, K.:* Die Einbettungsmethode. Fortschr. Min. Krist. Petrogr. 7 (1922) S. 3.

[109] *Stoll, P.:* Die Schnelldiagnose mittels Phasenkontrastmikroskopie in der gynäkologischen Sprechstunde. Zeiss-Mitt. 2 (1960) S. 33.
[110] – Gynäkologische Vitalcytologie in der Praxis. Funktion · Mikrobiologie · Neoplasie. Atlas der Phasenkontrastmikroskopie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag 1969.
[111] *Strugger, S.:* Die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens zum Studium der Pflanzenzelle. Z. Naturforsch. 2b (1947) S. 146.
[112] *Thaer, A.:* Ein Beitrag zur lichtmikroskopischen Mineralbestimmung in Feinstäuben, insbesondere des Kohlenbergbaus. Staub 14 (1954) S. 555.
[113] – Methoden und Instrumente für die mikroskopische Feinstaubuntersuchung. Leitz-Mitt. 2 (1961) S. 17.
[114] *Url, W.:* Das Endoplasmatische Retikulum von Desmidiaceen im Phasenkontrast. Protoplasma 64 (1967) S. 26.
[115] –, *Bolhar-Nordenkampf, H.:* Beiträge zur Frage der lichtmikroskopischen Sichtbarkeit des endoplasmatischen Retikulums in Pflanzenzellen. Österr. Bot. Z. 112 (1965) S. 586.
[116] *Weber, A. P.:* Das Phasenkontrastverfahren nach *Zernike* als Hilfsmittel für mikroskopische Untersuchungen durchsichtiger Stoffe. Optik 4 (1948) S. 213.
[117) *Wilska, A.:* Observations with the Anoptral-Microscope. Mikroskopie. 9 (1954) S. 1.
[118] *Wolter, H.:* Experimentelle und theoretische Untersuchungen zur Abbildung nichtabsorbierender Objekte. Ann. Physik 7 (1950) S. 33.
[119] – Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendbarkeit bei chemischen Untersuchungen. Fortschr. chem. Forsch. 3 (1954) S. 1.
[120] *Zernike, F.:* Beugungstheorie des Schneidenverfahrens und seiner verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode. Physica 1 (1934) S. 689.
[121] – Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. Z. Physik 36 (1935) S. 848; Z. Techn. Physik 16 (1935) S. 454.
[122] – Phasecontrast, a new Method for the Microscopic Observation of Transparent Objects. Parts I and II. Physica 9 (1942) S. 686 u. 974.
[123] – Wie ich den Phasenkontrast entdeckte. Physikalische Blätter (1955) S. 159.
[124] *Zinser, H. K.:* Klinisch-mikroskopische Studien mit dem Phasenkontrastverfahren. Jenaer Jb. (1950) S. 145.
[125] – Zytodiagnostik in der Gynäkologie. Jena 1951.

Literatur zu Abschnitt 6.1.3.

[126] *Bajer, A.; Allen, R. P.:* Structure and Organization of the Living Mitotic-Spindle of Haemanthus Endosperm. Science 151 (1966) S. 572.
[127] *Barer, R.:* Determination of Dry Mass. Thickness, Solid and Water Concentration in Living Cells. Nature 172 (1953) S. 1097.
[128] – Phase contrast and interference microscopy in cytology. In: *Oster-Pollister:* Physical techniques in biological research. Bd. III: Cells and Tissues. New York 1956, S. 29.
[129] – Refractometrie and interferometry of living cells. J. O. S. A. 47 (1957) S. 545.
[130] –, *Ross, K. F. A.; Tkaczyk, S.:* Refractometry of Living Cells. Nature 171 (1953) S. 720.
[131] *Bessis, M.; Thiery, J. P.:* Les Cellules du Sang Vues au Microscope à Interferences (System Nomarski). Rev. d'Hématologie 12 (1957) S. 518.
[132] *Beyer, H.:* „Interphako" – ein neues Interferenzmikroskop für Durchlicht zur Durchführung genauer Gangunterschiedsmessungen. Silikat Journal 5 (1966) S. 135.
[133] – Einrichtung für mikroskopische Refraktometrie. Jenaer Rdsch. 18 (1973) S. 97–99.
[134] – Interferenzmikroskopische Brechzahl- und Größenbestimmungen an kleinen Kornfraktionen und kleinen Flüssigkeitsmengen. Feingerätetechnik 22 (1973) S. 177–180; Jenaer Rdsch. 18 (1973) S. 176–179.
[135] – Theorie und Praxis der Interferenzmikroskopie. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest & Portig K. G. 1974.
[136] –, *Schöppe, G.:* Interferenzeinrichtung für Durchlichtmikroskopie. Jenaer Rdsch. (1965) S. 99.
[137] *Davies, H. G.:* The Determination of Mass and Concentration by Microscope Interferometry. Gen. Cytochem. Meth. 1 (1958) S. 55. In: *I. F. Danielli:* General Cytochemical Methods. New York 1958.
[138] –, *Engström, A.; Lindström, B.:* A Comparison between X-ray Absorption and Optical InterferenceMethods for the Mass Determination of Biological Structures. Nature 172 (1953) S. 1041.
[139] –, – Interferometrie and X-Ray Absorption Studies of Bone Tissues. Exp. Cell Res. 7 (1954) S. 243.
[140] *Dyson, J.:* Un nouveau microscope interferentiel. Proc. Roy. Soc. A 204 (1950) S. 170.
[141] -- An interference microscope for the accurate measurements of optical thickness. Nature 171 (1953) S. 743.
[142] *Dyson, J.:* Some considerations effecting the design of interference microscopes. J. O. S. A. 47 (1957) S. 557.
[143] *Françon, M.:* Oculaire interférentiel à contrastes colorés ou non. Microscopie 8 (1953) S. 260.
[144] – Étude et application d'un interféromètre a polarisation. Optica Acta 1 (1954) S. 50.
[145] *Gahm, J.:* Die Untersuchung anisotroper Präparate mit der Interferenzanordnung nach Jamin-Lebedeff. Zeiss-Mitt. 2 (1962) S. 389.
[146] -- Die Polarisationsmikroskopie und Zweistrahl-Interferenzmikroskopie im Durchlicht. Opton-Informationen (1966) S. 47.
[147] – Ein neues Mikro-Interferenz-Refraktometer. Zeiss-Informationen (1967) S. 94.

[148] *Galjaard, H.:* Histochemisch en interferometrisch onderzoek van hyalin kraakbeen. Diss. Med. Fakul. Univ. z. Leiden (Holland) 1962.

[149] –, *Szirmai, J.A.:* Determination of the dry mass in tissue sections by interference microscopy. J. Roy. Micr. Soc. 84 (1965) S.27.

[150] *Grehn, J.:* Das Durchlicht-Interferenz-Mikroskop – ein Meßinstrument des Biologen. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. I/2 (1959) S.35.

[151] *Günther, G.:* Trockengewichtsuntersuchungen an Zellen von normalen und geschädigten Lebern. Inaug. Diss. Ffm 1963. Gekürzt als: Trokkengewicht und Wassergehalt von Kern und Cytoplasma normaler und geschädigter menschlicher Leberzellen. Frankf. Z. f. Path. 74 (1965) S.239.

[152] *Hager, H.; Pehland, H.:* Zur Theorie der interferenzmikroskopischen Trockengewichtsbestimmung am biologischen Objekt. Acta Histochem. 9 (1960) S.216.

[153] *Hale, J.H.:* The Interference Microscope in Biol. Research. Edinbourgh, London 1958.

[154] *Hofmeier, G.; Grundmann, E.:* Interferenzmikroskopische Trockenmassenbestimmungen an Rattenleberzellkernen nach partieller Hepatektomie. Beitr. pathol. Anat. 126 (1962) S.413.

[155] *Ingelstam, E.; Johannson, L.P.:* Correction due to aperture in transmission interference microscopes J. Scient. Instr. 35 (1958) S.15.

[156] –, –, *Bruce, C.F.:* Obliquity corrections in transmission interference. J. Scient. Instr. 36 (1959) S.246.

[157] *Krug, W.; Lau, E.:* Ein Interferenzmikroskop für Durch- und Auflichtbeobachtungen. Ann. Physik 6 (8) (1951) S.329.

[158] –, *Rienitz, J.; Schulz, G.:* Beiträge zur Interferenzmikroskopie. Berlin 1961.

[159] *Lebedeff, A.A.:* L'interféromètre à polarisation et ses applications. Rev. d'Opt. 9 (1930) S.385.

[160] *Leitz:* Zweistrahl-Interferenzzusatz nach *Jamin-Lebedeff.* Leitz-Mitt. 4 (1967) S.58.

[161] *Mellors, R.C.; Hlinka, J.:* Interferometric Measurements of the Dry Weight of Genetic Materials in Sperm Nuclei. Exp. Cell Res. 9 (1955) S.128.

[162] *Nomarski, G.:* Interféromètre à polarisation. Franz. Pat. 1 059 123, 1952.

[163] – Vorrichtung zur Untersuchung von Licht durchlassenden oder an ihrer Oberfläche reflektierenden, nur auf die Phase von Lichtwellen einwirkenden Körpern. Patent der Bundesrepublik vom 13.5.1953.

[164] *Osterberg, H.:* Phase and Interference Microscopy. In: *Oster, G.; Pollister, A.W.:* Physical Techniques in Biological Research. Bd. I: Optical Techniques. New York 1955, S.377.

[165] *Ostrowski, K.; Darzynkiewicz, Z.; Sawicki, W.; Stocka, Z.:* The possibilities of application of the new model of an interference microscope (MPI) in biological research. Folia Histochem. et Cytochem. 1 (1963) S.553.

[166] –, –, –, – Dry mass of epithelial cells from vagina of mice in the course of the oestrus cycle measured by interference microscopy. Acta Biochem. Polonica 11 (1964) S.99.

[167] *Pehland, H.; Hager, H.:* Zur Theorie der interferenzmikroskopischen Trockengewichtsbestimmung an biologischen Objekten. Z. wiss. Mikr. 64 (1959) S.271.

[168] *Pluta, M.:* Mikroskopia Fazowo-Kontrastowa i Interferencyjna. Warszawa 1965.

[169] – Interferenz-Polarisationsmikroskop mit veränderlicher Bildaufspaltung. Pomiary Automatyka Kontrola (1965) S.78.

[170] *Ross, K.F.A.:* Phase Contrast and Interference Microscopy for Cell Biologists. London 1968.

[171] *Sandritter, W.:* Advantages and Disadvantages of the Interference Microscopic Cytology. Acta Cytologia II (1958) S.321.

[172] –, *Schiemer, H.G.; Alt, W.; Müller, P.; Behrouzi, E.:* Histochemie von Sputumzellen. III. Interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen. Frankf. Z. f. Path. 69 (1958) S.167.

[173] –, *Müller, D.:* Vergleichende röntgenhistographische und interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen. Exp. Cell Res. 15 (1959) S.158.

[174] –, *Schiemer, H.G.; Alt, W.:* Das Interferenzmikroskop im Dienste der Cytologie und Krebsforschung. Klin. Wschr. 12 (1960) S.590.

[175] –, –, *Uhlig, H.:* Interferenzmikroskopische Trockengewichtsbestimmungen an Zellen mit haploidem und diploidem Chromosomensatz. Acta Histochem. 10 (1960) S.155.

[176] –, –, *Kraus, H.; Dörrien, U.:* Interferenzmikroskopische Untersuchungen über das Wachstum von Einzelzellen (HeLa-Zellen) in der Gewebekultur. Frankf. Z. f. Path. 70 (1960) S.271.

[177] *Schiemer, H.G.:* Vergleichende Trockengegewichtsbestimmungen am Kern und Cytoplasma verschiedener Karzinome. Verh. Dtsch. Ges. Path. 43. Tg. (1959) S.359.

[178] – Farbige Interferenzmikroskopie. Acta Histochem. 9 (1960) S.218.

[179] *Schulz, G.:* Interferentielle Dickenmessung und Brechungsindexbestimmung mikroskopischer Objekte. Phys. Verh. 5 (1956) S.141.

[180] *Smith, F.H.:* Microscopes. Brit. Pat. 639013, Class 97(i), Group XX. 1947.

[181] – Microscopic Interferometrie. Research 8 (1955) S.385.

[182] *Stockem, W.:* Differentieller Interferenzkontrast bei Amöben. Mikroskopie 24 (1970) S.332.

Literatur zu Abschnitt 6.1.4.

[183] *Ambronn, H.; Frey, A.:* Das Polarisationsmikroskop. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest & Portig K.G. 1926.

[184] *Beger, P.J.:* Erfahrungen mit dem Leitzschen U-Tisch. Refraktometer. Z. f. angew. Mineralogie (1943).

[185] *Burri, C.:* Das Polarisationsmikroskop. Basel: Verlag Birkhäuser 1950.

[186] *Emmons, R C.:* The universal stage with five axes of rotation. Washington: Geological society of America 1943.

[187] *Freund, H.F.:* Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd. I. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1957.

[188] *Gaubert, P.:* Mesure des indices de réfraction d'un solide par immersion dans un liquide porté à une temperature déterminée. Bull. Soc. Franç. Min. 45 (1922) S.89.

[189] *Gause, H.:* Entwicklungstendenzen in der Polarisationsmikroskopie. Chem. d. Erde 22 (1962) S.111.

[190] *Hartshorne, A.H.; Stuart, A.:* Crystals and the polarizing microscope. London: Edward Arnold a. Co. 1950.

[191] *Hinnawi, E.E.El.:* Methods in chemical and mineral microscopy. Amsterdam: Elsevier Publishing Company 1966.

[192] *Kleber, W.:* Einführung in die Kristallographie. Berlin: VEB Verlag Technik 1968.

[192a] *Меланхолин, М. Н.:* Методы исследования оптических свойств кристаллов. Москва, „Недра", 1970 г.

[193] *Pfeiffer, H.H.:* Das Polarisationsmikroskop als Meßinstrument in Biologie und Medizin. Braunschweig: F. Vieweg & Sohn 1949.

[194] *Pockels, H.:* Kristalloptik. Leipzig: BSB B.G. Teubner, Verlagsges. 1906.

[195] *Ramachandran, G.N.; Ramaseshan, S.:* Crystal optics. In: Handb. d. Physik (*Flügge*). Bd. XXV/1. Heidelberg: Springer-Verlag 1965.

[196] *Rinne, F.; Berek, M.:* Anleitung zu optischen Untersuchungen mit dem Polarisationsmikroskop. Stuttgart: E.Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung 1953.

[197] *Sarantschina, G.M.:* Die Fedorow-Methode. Berlin: VEB Verlag Technik 1963.

[198] *Scheuner, G.; Hutschenreiter, I.:* Polarisationsmikroskopie in der Histophysik. Leipzig: VEB Verlag Georg Thieme 1972.

[199] *Schmidt, W.J.:* Instrumente und Methoden zur mikroskopischen Untersuchung optisch anisotroper Materialien mit Ausschluß der Kristalle. In: Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd.I/1. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1957.

[200] *Schumann, H.:* Orthoskopische und konoskopische Beobachtungswerte im U-Tisch. Mikroskopie 6 (1951) 104ff.

[201] *Seyfarth, H.H.; Beyer, H.; Emons, H.H.:* Neue Zeiss-Mikroskope für die Anwendung in der chemischen Forschung und Industrie für quantitative Produktenkontrolle. Jenaer Rdsch. (1970) H.4.

[202] –, *Rüprich, G.:* Zur Anwendung mikroskopischer Methoden bei der Untersuchung teilkristalliner organischer Hochpolymerer. Jenaer Rdsch. (1970) H.4.

[203] *Tatarski, W.B.:* Kristalloptische und Immersionsmethoden zur Untersuchung von Mineralien. Moskau: Verlag „Nedra" 1965.

[204] *Taylor, E.D.:* Optical properties in cleavage flakes of rock-forming minerals. Contrib. Geol. Min. Univ. Labal, Quebec 78 (1948).

[205] *Tertsch, H.:* Die stereographische Projektion in der Kristallkunde. Wiesbaden: Verlag für angewandte Wissenschaften 1954.

[206] *Tsuboi, S.:* A dispersion method of determining plagio-clases in cleavage flakes. Min. Mag. 20 (1923) S.108.

[207] *Winchell, A. N.; Winchell, H.:* Microscopic characters of artificial inorganic solid substances, optical properties of artificial minerals. New York, London: Academic Press 1964.

[207a] *Волынский, И. С.:* Определение рудных минералов под микроскопом. Москва, „Недра" 1966 г.

Literatur zu Abschnitt 6.1.5.

[208] Acta Histochemica Suppl. IX (1971): Fluoreszenz-Zytophotometrie.

[209] *Adamczyk, B.:* Die Fluoreszenzmikroskopie als Nachweismethode von Tuberkelbakterien. Röntgen- und Laboratoriumspraxis 14 (1961) S.40.

[210] *Berguist, R.:* The Laser in Fluorescent Microscopy or Watch that Lymphocyte. Electro-Optical-Systems Design (1974) S.24–27.

[211] *Bertalanffy, F.D.:* Evaluation of the Acridine-orange Fluorescence Microscope Method for Cytodiagnosis of Cancer. Ann. New York Acad. Sci. 95 (1962) S.715.

[212] *Böhm, N.; Sprenger, E.:* Fluorescence Cytophotometry: A Valuable Method for the Quantitative Determination of Nuclear Feulgen – DNA. Histochemie 16 (1968) S.100.

[213] *Caspersson, T.; Zech, L.; Johansson, C.; Modest, E.J.:* Identification of Human Chromosomes by DNA-Binding Fluorescent Agents. Chromosoma 30 (1970) S.215.

[214] *Coons, A.H.:* The Diagnostic Application of Fluorescent Antibodies. Schweiz. Z. Allg. Pathol. Bakt. 22 (1959) S.700.

[215] –, *Kaplan, N.H.:* Localisation of Antigen in Tissue Cells. J. Exp. Med. 91 (1950) S.1.

[216] *Dutz, W.; Ernst, B.:* Technik der Immunhistologie. Z. med. Labortechnik 7 (1966) H.4, S.206.

[217] *Eder, H.; Kayser, G.:* Zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Erythrozyten. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. Bd. VI, Nr.1 (1973) S.14.

[217a] *Мейсель, М. Н.:* Флуоресцентная микроскопия и цитохимия в общей микробиологии.

В книге „Успехи микробиологии“, Москва, „Наука“, 1973 г.

[218] *Eger, W.; Kämmerer, H.; Trapp, L.:* Simultane fluoreszenz- und polarisationsmikroskopische Untersuchungen von unentkalkten Dünnschliffen von Knochengewebe. Zeiss-Informationen 15 (1967) H. 64, S. 64.

[219] *Eisenbrand, J.:* Fluorometrie. Stuttgart: Wiss. Verlag GmbH 1966.

[220] *Falck, B.; Hillarp, N.A.; Thieme, G.; Torp, A.:* Fluorescence of catechol amines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 10 (1962) S. 348.

[221] *Faulk, W.P.; Hijmans, W.:* Recent Developments in Immunofluorescence. Progr. Allergy Vol. 16 (Karger, Basel 1972) S. 9.

[222] *Fey, H.; Braun, K.:* Erfahrungen mit der Quarz-Jodlampe für Fluoreszenzmikroskopie. Festschrift Wild, Heerbrugg (1971).

[223] – Der Einsatz der Immunufloreszenz in der medizinischen Diagnostik. Pädiat. Fortbildk. Praxis, Vol. 35 (Karger, Basel 1972) S. 103.

[224] *Graumann, W.; Neumann, K.-H.:* Handbuch der Histochemie. Stuttgart: Verlag Gustav Fischer 1958.

[225] *Haitinger, M.:* Fluoreszenzmikroskopie. 2. Aufl. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest & Portig K. G. 1959.

[226] *Harms, H.:* Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Kamp-Lintfort: Staufen-Verlag 1965.

[227] *Holborow, E.J.:* Standardization in immunofluorescence. Blackwell, Oxford. Edinburgh 1970.

[228] *Jensen, V.A.; Olsen, W.:* Colour Fluorescein Angiography of the Fundus. Acta Ophthalmologica Vol. 52 (1974) S. 501.

[229] *Jentzsch, K.-D.:* Immunfluoreszenz in der medizinischen Mikrobiologie. Leipzig: J. A. Barth Verlag 1967.

[230] *Jongsma, P.M.; Hijmans, W.; Ploem, J.:* Quantitative Immunfluorescence-Standardization and Calibration in Microfluorometry. Histochemie 25 (1971) S. 329.

[231] *Koch, K. F.:* Fluoreszenz-Mikrophotographie. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. Bd. VI (1974) S. 149.

[232] *Körting, H.-J.; Hindersin, P.; Voß, G.R.;* Bestimmung der relativen Antigenmenge in Zellen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop-Photometer FLUOVAL photometrie. Jenaer Rdsch. 19 (1974) S. 212.

[233] *Kosenow, N.:* Lebende Blutzellen im Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Mikroskop. Basel, New York: S. Karger Verlag 1956.

[234] *Kraft, W.:* Die Fluoreszenzmikroskopie und ihre gerätetechnischen Anforderungen. Leitz-Mittlg. Wiss. Techn. Bd. V, Nr. 7 (1972) S. 193.

[235] *Ludwig, H.; Knapp, W.:* Immunfluoreszenzdiagnose innerer Erkrankungen. Wiener Klin. Wochenschrift 86 (1974) S. 709.

[236] *Nairn, R.C.:* Fluorescent protein tracing. 3rd ed. Livingston, Edinburgh 1969.

[237] *Pauli, F.:* Fluorescence Microscopy in Organic Geochemistry. Mikroskopie 30 (1974) S. 202.

[238] *Pflug, H.D.:* Fluoreszenzmessungen an Gesteinen und Fossilien. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 3 (1966) H. 6, S. 183.

[239] *Ploeg, M. van der; Ploem, J.S.:* Filter Combinations and Light Sources for Fluorescence Microscopy of Quinacrine Mustard or Quinacrine Stained Chromosomes. Histochemie 33 (1973) S. 61.

[240] *Ploem, J.S.:* The Use of a Vertical Illuminator with Interchangeable Dichroic Mirrors for Fluorescence Microscopy with Incident Light. Z. wiss. Mikr. u. mikr. Techn. 68 (1967) S. 129.

[241] – The Microscopic Differentiation of the Colour of Formaldehyde- induced Fluorescence. Progress in Brain Research Vol. 34 (1971) S. 27 bis 37.

[242] *Porro, T.J.; Dadik, S.P.; Green, M.; Morse, T.H.:* Fluorescence and Absorption Spectra of biological Dyes. Stain Technol. 38 (1963) S. 37.

[243] *Reichert, C.:* Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen. Rezepte und Tabellen. 4. Aufl. Wien: Verlag C.Reichert, Optische Werke AG.

[244] *Rigler, R., jun.:* Microfluorometric Characterization of Intracellular Nucleid Acids and Nucleoproteins by Acridine Orange. Acta Physiol. Scand. 67 (1966) Suppl. S. 267

[245] *Ruch, F.; Trapp, L.:* Ein Mikroskop-Fluorometer mit Kurzzeit-Anregung und Schaltfolgesteuerung. Zeiss-Inf. 81 (1973) S. 59–60.

[246] *Sernetz, M.; Thaer, A.:* A capillary fluorescence standard for microfluorometry. J. Microscopy 91 (1970) S. 43.

[247] *Stockinger, L.:* Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen. Protoplasmologia. Handb. d. Protoplasmaforsch. Bd. II: Cytoplasma D 1. Wien: Springer-Verlag 1964.

[248] *Strugger, S.:* Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hannover: Verlag Schaper 1949.

[249] *Thaer, A.; Sernetz, M.:* Fluorescence Techniques in Cell Biology. Springer-Verlag 1973.

[250] *Wagner, M.:* Fluoreszierende Antikörper und ihre Anwendung in der Mikrobiologie. Jena: VEB G. Fischer Verlag 1967.

[251] *Walker, P.J.; Watts, J.M.A.:* Permanent fluorescent test slides. J. of Microscopy 92 (1970) S. 63.

[252] *Walter, F.:* Fluoreszenzmikroskopie in Biologie und Medizin. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. 5 (1970) H. 2. S. 122.

[253] *Хавкин, Т.Н.; Кудрявцев, В.Н.; Берлин; П.Б.; Кудрявцева, М.В.;* Фотографический Метод флуориметрий ДНК в хромосомах Человека при использований луминесцентного варианта реакций фёльгена. Цитология том XII. 1970 №9.

Literatur zu Abschnitt 6.1.6. und 6.1.7.

[254] *Asselmeyer, F.:* Der Einfluß des Glanzwinkels auf die Abbildung von Achsenpunkten bei dem Kugelzonenspiegel für monochromatische Röntgenstrahlen. Z. f. angew. Phys. 6 (1954) S. 272.

[255] *Beneke, G.:* Extrapolationsverfahren zur Korrektur der UV-Absorptionskurven. Acta Histochem., Suppl. (1965) H. 6, S. 239.

[256] *Blochin, M.A.:* Physik der Röntgenstrahlen. Berlin: VEB Verlag Technik 1957.

[257] *Blout, E.R.; Bird, G.R.:* Infrared microspectroscopy II. J. Opt. Soc. Amer. 41 (1951) S. 547.

[258] –, *Bird, G.R.; Abbate, M.J.:* Infrared microspectroscopy III. A capillary cell for liquids. J. Opt. Soc. Amer. 42 (1952) S. 966.

[259] *Bostrom, R.C.; Holcomb, W.G.:* CYDAC – A digital scanning cytophotometer. IEEE Internation. Convention Record, part. (1963) H. 9.

[260] *Brodski, B.J.:* Trofika Kletki. Moskau: Nauka 1966.

[261] *Caspersson, T.; Lomakka, G.:* Scanning microscopy techniques for high resolution quantitative cytochemistry. Scanning Technique in Biology and Medicine. Ed. *P.O'B. Montgomery*, Annals of the New York Academy of Science, Vol. 97, S. 449.

[262] – Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkerns. Scand. Arch. Physiol. 73 (1936) H. 8. Cell growth and cellfunction. New York: Norton & Co. 1950.

[263] *Cole, A.R.H.; Jones, R.N.A.:* A reflecting microscope for infrared spectrometry. J. Opt. Soc. Amer. 42 (1952) S. 348.

[264] *Combee, B.; Recourt, A.:* Philips Contact Microradiograph CMR–5. (Ein einfaches Gerät für Kontakt-Mikroradiographie zwischen 1,5 und 5 kV). Philips' Technische Rundschau 19 (1957/58) S. 189.

[265] *Davies, H.G.; Wilkins, M.H.F.; Boddy, R.G. H.B.:* Cell crushing: a technique for greatly reducing errors in microspectrometry. Exp. Cell. Res. 6 (1954) S. 550.

[266] *Deely, E.M.:* An integrating microdensitometer for biological cells. J. Scient. Instr. 32 (1955) S. 263.

[267] *Duijn, P. van:* Remarks on the two-wavelength method. Acta Histochem., Suppl. (1965) H. 6, S. 61.

[268] *Dyson, J.:* Optics of the focusing X-ray microscope. Proc. Phys. Soc., Sect. 65 (1952) S. 580.

[269] *Ehrenberg, W.:* X-ray optics: The Production of Converging beams by total reflection. J. Opt. Soc. Amer. 39 (1969) S. 741.

[270] *Edström, J.E.:* Extraction, hydrolysis, and electrophoretic analysis of ribonucleic acid from microscopic tissue units (Microphoresis). J. Biophys. Biochem. Cytology 8 (1960) S. 39.

[271] *Engström, A.:* Historadiography. In: Analoptical Cytology, ed. by *R.C. Mellors*. New York, Toronto, London: McGraw-Hill Book Company 1955.

[272] *Exner, G.:* Zur Theorie und Praxis der Mikrophotometrie strukturierter Objekte. Diss. Jena 1959.

[273] –, *Schreiber, W.:* Mikrophotometrische Untersuchungen an Modellpräparaten. In: Optik und Spektroskopie aller Wellenlängen. Berlin: Akademie-Verlag GmbH 1962.

[274] *Forer, A.:* Local reduction of spindle fiber birefringence in living nephritoma suturalis (Loew) spermatocytes induced by ultraviolet microbeam irradiation. J. Cell Biol. 25 (1965) S. 95.

[275] *Françon, M.:* Einführung in die neueren Methoden der Lichtmikroskopie. Karlsruhe: Verlag G. Braun 1967.

[276] *Freil, H.-I.; Weise, H.:* Der Bildwandler – ein photoelektrisches Gerät zur bildmäßigen Erschließung des ultravioletten und infraroten Spektralbereichs und zur Bildverstärkung. Jenaer Rdsch. 4 (1959) S. 93.

[277] *Garlick, G.F.J.:* Solid state image amplifiers. J. Scient .Instr. 34 (1957) S. 473.

[278] *Görlich, P.:* Die Benutzung lichtempfindlicher Organe in der Lichtmikroskopie. Wissenschaftliche Annalen 5 (1956) S. 724.

[279] –, *Krohs, A.; Pohl, H.-J.; Zerbst, G.:* Über serienmäßig hergestellte Bildwandler und die Möglichkeit der Charakterisierung ihrer Strahlungsverstärkerwirkung. Z. f. angew. Phys. einschl. Nukleonik 9 (1957) S. 561.

[280] *Grundmann, E.:* Die Mikrospektrophotometrie der Zelle im sichtbaren Spektralbereich. Dtsch. med. Wschr. 88 (1963) S. 98.

[281] *Hamiter, L.C.:* Infrared techniques for the reliability enhancement of microelectronics. SCP Solid State Techn. 10 (1967) H. 3, S. 41.

[282] *Hancox, N.N.; Kruszynski, J.:* Refractometry of tissue sections by phase-contrast-microscopy. Exp. Cell Res. 11 (1956) S. 327.

[283] *Heiland, W.:* Registrierendes Mikrodensitometer hoher Auflösung. Z. Instrkde. 75 (1967) S. 252.

[284] *Heimann, W.:* Elektronenoptische Bildwandler und Bildverstärker. Z. Instrkde. 73 (1965) S. 108.

[285] *Henke, B.L.:* In: *Engström, A.*, u.a.: X-ray Microscopy and Microanalysis. Stockholm: Elsevier Publishing Company 1960).

[286] *Herman, R.A.:* Aspects of using infrared for electronic circuit diagnosis. Materials evaluation 25 (1967) S. 201.

[287] *Hink, W.:* Experimentelle Untersuchungen an einem Totalreflexions-Röntgenmikroskop. Diss. Fr. Universität Berlin 1956.

[288] *Hoppe, W.; Trurnit, H.J.:* Geometrie und Kristallphysik einer Röntgenlinse für monochromatische Strahlung. Z. Naturforsch. 29 (1947) S. 608.

[289] *Jansen, M.T.:* On the refractive index of histo-

logical tissue sections in visible and ultraviolet light. Exp. Cell. Res. 15 (1958) S.239.
[290] – A simple scanning et cytophotometer. Histochemie 2 (1961) S.342.
[291] *Kasha, M.:* Transmission Filters of the Ultraviolet. J. Opt. Soc. Amer. 38 (1948) S.929.
[292] *Kaufmann, S.:* Messung der Transmission von Elementarfäden aus Polyamid 6 und Polyester mit polarisierter Strahlung im ultravioletten Spektralbereich. Faserforschung und Textiltechnik 20 (1969) S.47.
[293] *Kiefer, G.; Sandritter, W.:* Die Nukleinsäuren des Cytoplasmas. Handb. d. Protoplasmaforschung (Protoplasmatologie). Bd. II/B/2b. Wien, New York: Springer-Verlag 1966.
[294] *Kirkpatrick, P.; Pattee, H.H. Jr.:* Approaches to X-ray microscopy. In: Advances in biological and medical physics. Vol. III. New York: Acad. Press 1953.
[295] *Kirsten, C.:* Einrichtung zur Messung der Oberflächentemperatur mikroskopischer Objekte. Jenaer Rdsch. 13 (1968) H.3, S.178.
[296] *Köhler, A.:* Mikrophotographische Untersuchungen mit ultraviolettem Licht. Z. wiss. Mikr. 21 (1904) S.129 u. 274.
[297] – Einige Neuerungen auf dem Gebiet der Mikrophotographie mit ultraviolettem Licht. Naturwiss. 21 (1933) S.165.
[298a] *Королев, Н.В.; Рюхин, В.В.; Горбунов, С.А.:* Эмиссионный спектральный микроанализ. Ленинград, «Машиностроение», 1971 г.
[298b] *Kortüm, G.:* Kolorimetrie und Spektralphotometrie. Berlin: Springer-Verlag 1942.
[299] *Kortum, H.:* Thermische Strahlungsempfänger nach *Kortum*. Feingerätetechnik 18 (1969) H.9, S.441.
[300] –, *Müller, J.E.:* Über Mikropyrometer für Forschung und Betriebsmeßtechnik. Feingerätetechnik 18 (1969) H.8, S.339.
[301] *Krug, H.:* Grundlagen und Methodik der photographischen Mikrospektrophotometrie. Acta Histochem. 14 (1962) S.42.
[302] – Arbeitsbesprechung für Mikrophotometrie der Arbeitsgemeinschaft Morphologie in der DDR. Acta Histochem. 22 (1965) S.179.
[303] – Zur Anwendung der Histophotometrie im sichtbaren und im ultravioletten Licht. Acta Histochem. 34 (1969) S.51.
[304] *Lang, W.:* Ermittlung des DNS-Gehalts einzelner Zellen aus Extinktionsmessungen mit Hilfe der Cytospektrophotometrie. Teil I und II. Optik 23 (1965/66) S.214 u. S.235.
[305] *Leuchtenberger, C.:* Quantitative determination of DNA in cells by Feulgen microspectrophotometry. In: „General cytochemical methods". Vol. 1. New York: Ed. *J.F. Danielli;* Academic Press 1958.
[306] *Lindström, B.:* Röntgen-Absorption Spectrophotometrie in Quantitative Cytochemistry. Stockholm: Acta Radiologica, Suppl. 125 (1955).
[307] *Lucht, G.; Harker, D.:* An X-ray Microscope Using Mirrors of Adjustable Curvature. Rev. Scient. Instr. 22 (1951) S.392.
[308] *Marks, B.G.; Revesz, C.; Walker, M.:* Infrared testing of microcircuits. Elektro-Technol. 76 (1965) H.10, S.112.
[309] *Mendelsohn, M.I.:* The two-wavelength method of microspectrophotometry. I. A microspectrophotometer and tests on model systems. J. biophys. biochem. Cytol. 4 (1958) S.407.
[310] – II. A set of tables to facilitate the calculations. J. biophys. biochem. Cytol 4 (1958) S.415.
[311] – III. An extension based on photography color transparencies. J. biophys. biochem. Cytol. 4 (1958) S.425.
[312] – IV. A new solution. J. biophys. biochem. Cytol. 11 (1961) S.509.
[313] – Scanning microscopy as input to a digital computer. Frankfurt: 2. Intern. Kongr. für Histo- und Cytochemie 1964.
[314] *Meyer-Arendt, J.:* Kritische Bewertung von Ultraviolettfiltern. Mikroskopie 7 (1952) S.396.
[315] *Montel, M.:* Reflexion et focalisation des rayons X par les miroirs. Paris: Thèses 1958.
[316] – Système de miroirs sphériques permettant d'obtenir des images agrandies en lumière X. Compt. Rendus 239 (1954) S.39.
[317] *Müller, D.:* Die Bedeutung des Schwarzschild-Villiger-Effekts für die Mikrospektrophotometrie. Acta Histochem., Suppl. (1965) H.6, S.209.
[318] *Müller, E.A.W.:* Die Schwächung von Röntgenstrahlen im Wellenlängenbereich $\lambda = 0{,}01\ \mu m$ bis $\lambda = 10\ \mu m$. I. Allgemeine Grundlagen. ATM-Blatt 9114–17 (Februar 1956).
[319] *Nähring, E.:* Die Dispersion der Röntgenstrahlen. Z. Physik 31 (1930) S.401.
[320] – Die Totalreflexion der Röntgenstrahlen. Z. Physik 31 (1930) S.799.
[321] *Naora, H.:* Microspectrophotometry in visible light range. In: „Handbuch d. Histochemie". Bd. I/1. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1958.
[322] *Neuhoff, V.* (Herausgeber): Micromethods in molecularbiology. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 1973.
[323] New Products: „Infrared Microscope". SCP Solid State Techn. 10 (1967) H.12, S.67.
[324] Nippon Electric Co., Tokyo: Infrared Microscope. Medical and Biological Illustr. 12 (1962) S.193.
[325] Ong Sing Poen: Microprojection with X-rays. Martimus Nijhoff 1959.
[326] *Ornstein, L.:* The distributional error in microspectrophotometry. Lab. Invest. 1 (1952) S.250.
[327] *Patau, K.:* Absorption microphotometry of irregular shaped objects. Chromosoma (Berlin) 5 (1952) S.341.
[328] *Petermann, D.,* u.a.: Infrared radiometry of semiconductor devices. Microelectr. Rel. 6 (1967) S.307.

[329] *Pliquett, F.:* Anwendung des UV-Mikroskops MUF–6 in der Histochemie. Acta Histochem. 34 (1969) S. 27.
[330] *Pollister, A. W.; Ornstein, L.:* Cytophotometric Analysis in the Visible Spectrum. In: „Analytical Cytology". New York, Toronto, London: Ed *R.C. Mellors;* McGraw-Hill Book Company 1955.
[331] *Preisser, G.:* Stabilisierungsprobleme. Acta Histochem., Suppl. (1965) H. 6, S. 163.
[332] *Prince, E.:* The resolving power auf an X-ray microscope. J. appl. Phys. 21 (1950) S. 698.
[333] *Riesenberg, H.:* Über eine einfache, lichtstarke Ultrarot-Optik. Jenaer Jb. (1958) H. I, S. 27.
[334] – Wirkungsweise und Anwendungsmöglichkeiten des UV-Mikroskops vom VEB Carl Zeiss JENA. Acta Histochem. 34 (1969) S. 38.
[335] – Über zentralabschattungsfreie, rotationssymmetrische Spiegelsysteme mit besonderer Berücksichtigung ihrer Eignung als abbildende Optik für extrem weiche Röntgenstrahlen. Jenaer Jb. (1963) H. II, S. 250.
[336] – UV-Mikroskop mit Einrichtung für Photometrie. Jenaer Rdsch. 10 (1965) S. 132.
[337] – Optik in der Mikrophotometrie. Acta Histochem. 22 (1965) S. 194.
[338] *Rieser, L. H.:* Reflection of X-rays and the reflection microscope in X-ray microscopy and microradiography. Cambridge: ed. *by Cosslett, Engström, Pattee* 1956.
[339] *Roels, H.:* Die Plug-Methode. Acta Histochem., Suppl. (1965) H. 6, S. 73.
[340] *Ruch, F.:* Birefringe and dichroism of cells and tissues. In: „Physical Techniques in Biological Research". New York: Ed. *Oster, G.* and *Pollister, A. W.;* Academic Press 1956.
[341] – Ein Mikrospektrograph für Absorptionsmessungen im ultravioletten Licht. Z. wiss. Mikr. 64 (1960) S. 453.
[342] *Sandritter, W.:* Ultraviolettmikrospektralphotometrie. In: „Handb. d. Histochemie". Bd. I/1. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1958.
[343] – Über Einschlußmedien für die Photometrie im sichtbaren und ultravioletten Licht. Acta Histochem. 9 (1960) S. 192.
[344] –, *Kiefer, G.:* Methoden und Ergebnisse der Zytophotometrie und Interferenzmikroskopie (Verhandlungen der Gesellschaft für Histochemie auf dem IX. Symposium in Gießen vom 10. bis 13. Oktober 1963). Acta Histochem., Suppl. (1965).
[345a] –, *Müller, D.; Schäfer, H.; Schiemer, H.-G.:* Histochemie von Sputumzellen. II. Quantitative ultraviolett-mikrospektrophotometrische Nucleinsäurebestimmung. Frankf. Z. Path. 68 (1958) S. 710.
[345b] *Зарубина, И. Л.; Давыдова, М. И.; Кулаков, А. А.; Курапов, А. И.; Макаров, Ю. К.; Мамаев, А. И.; Маспова, Г. И.; Панов В. А.; Певзнер, Л. З.:* Новые микроскопы-фотометры, МЦФУ-I и МЦФВ-I Цитология №12, 1975 г.
[345c] *Зарубина, И. Л.; Кулаков, А. А.; Давыдова, М. И.; Смирнов, В. А.:* Современное состояние и перспективы развития аппаратуры для цитохимических исследований. «ЦТОЛОГИЯ» №2 1976 г.
[346] *Scharf, J.-H.; Höpfner, J.; Ziemann, Ch.:* Bemerkungen zur Auswertung histophotometrischer Meßwerte. Acta histochem. 30 (1968) S. 255.
[347] *Schiemer, H.-G.:* Neue Wege der Cytometrie auf dem Gebiete der Krebsforschung, der allgemeinen Biologie und der Pathologie. Klin. Wschr. 45 (1967) S. 393.
[348] *Schröder, R.:* Zur statistischen Verteilung verschiedener Meßgrößen in der Cyto- und Histochemie. Acta histochem. 30 (1968) S. 297.
[349] *Stern, J.:* Infrarot-Microscanner. Rev. Sci. Instr. 42 (1971) S. 1101.
[350] *Stiller, K.-J.:* Zu Fragen der Auswertung und der Fehlermöglichkeiten in der UV-Mikrospektralphotometrie. Acta Histochem. 34 (1969) S. 62.
[351] *Swift, H.; Rasch, E.:* Microphotometry with visible light. In: „Physical Techniques in Biological Research". Vol. III. New York: Ed. *G. Oster* and *A. Pollister;* Academic Press 1956.
[352] *Thaer, A.:* Der Leitz-Mikrospektrograph für den sichtbaren und UV-Bereich. Acta Histochem., Suppl. Bd. V (1965) H. 6, S. 103.
[353] UV-Kopplungsinterferenzfilter. Druckschriften des VEB Carl Zeiss JENA, Nr. 46–002–1.
[354] *Van Es, W. L.; Wisse, J. H.:* Narrow Band Pass Ultraviolet Filters for Continuous Determinations of Protein. Analyt. Biochem. 6 (1963) S. 135.
[355] *Vanzetti, R.; Hamiter, L.:* Fast scanning infrared microscope. JEEE Int. Conv. Record 14 (1966) S. 81.
[356] – IR-Mikroskopie, eine neue Methode der Mikroelektronik. radio menter electronic (1968) S. 257 u. 354.
[357] *Voß, G.-R.:* Einrichtung für Strahlenstich und Phasenkontrast-Fluoreszenz. Z. med. Labortechnik 5 (1964) S. 239.
[358] – AMPLIVAL photometrie, das Transmissions-Mikroskop-Photometer des VEB Carl Zeiss JENA. Jenaer Rdsch. 20 (1975) H. 3, S. 116.
[359] *Walker, P. M. B.:* Ultraviolet absorption techniques. In: „Physical Techniques in Biological Research". Vol. III. New York: Ed. *G. Oster* and *A. Pollister*; Academic Press 1956.
[360] – Ultraviolett microspectrophotometry. In: „General cytochemical methods". Vol. 1. New York, London: Ed. *J. F. Danielli;* Academic Press 1958.
[361] -A scanning and integrating spectrophotometer for very small objects. J. Scient. Instr. 40 (1963) S. 166.
[362] –, *Roschen, J.; Schlegel, E.:* An infrared scanning technique for the determination of temperature profiles in microcircuits. JEEE-Trans. ED 10 (1963) S. 263.
[363] *Ward, A.; McMaster:* Computer detection of cancer cells. Science (1966) H. 8, S. 32.

[364] *Weber, K.:* Strahlungsquellen für die Mikrophotometrie. Acta Histochem., Suppl. Bd. VI (1965) H. 6, S. 157.
[365] *Wetzel, R.; Buder, E.; Schälike, W.; Zirwer, D.:* Linearer Dichroismus bei Riesenchromosomen von Chironomus. Chromosoma (Berlin) 26 (1969) S. 201.
[366] –, *Zirwer, D.; Schälike, W.; Gallowski, H.; Schmidt, J.; Knüpffer, H.; Bonnke, H.:* An ultraviolet microspectrophotometer for measurements with polarised light. J. Scient. Instr., Ser. 2, Vol. 2 (1969) S. 841.
[367] *Wied, G.L.* (Herausgeber): Introduction to quantitative Cytochemistry. New York, London: Academic Press 1966.
[368] –, *Bahr, G.F.:* Introduction to quantitative cytochemistry. – Pattern recognition and cell sorting. New York: Academic Press 1969.
[369] –, – (Herausgeber): Introduction to quantitative cytochemistry, part II. New York, London: Academic Press 1970.
[370] –, – (Herausgeber): Automated cell identification and cell sorting. New York, London: Academic Press 1970.
[371] *Wolter, H.:* Spiegelsysteme streifenden Einfalls als abbildende Optiken für Röntgenstrahlen. Ann. Physik 10 (1952) S. 94.
[372] *Wood, J.R.; Goring, D.A.I.:* Ultraviolet microscopy at wavelengths below 240 nm. J. Microscopy (Oxford) 100 (1974) S. 105.
[373] *Woodworth, R.C.; Kravitz, E.C.:* An Adjustable Liquid Filter for the Middle Ultraviolet. Isolation of the 2804 A Line of Hg for Detecting Proteins in Solution. Anal. Biochem. 10 (1965) S. 179.

Literatur zu Abschnitt 6.1.8.

[374] *Beiser, A.:* Nuclear emulsion technique. Rev. Mod. Phys. 24 (1952) S. 273.
[375] *Beyer, H.:* Ein Mikroskop für die genaue und rationelle Vermessung von Kernspuren in Photoemulsionen. Jenaer Rdsch. 3 (1958) S. 135.
[376] *Blau, M.:* Die photographische Wirkung von H-Strahlen aus Paraffin und Aluminium. Z. Physik 34 (1925) S. 285.
[377] *Wambacher, H.:* Über Versuche, durch Neutronen ausgelöste Protonen photographisch nachzuweisen. II. Sitzber. (Wien) IIa, 141 (1932) S. 617.
[378] –, – II. Mitteilung über photographische Untersuchungen der schweren Teilchen in der kosmischen Strahlung. Einzelbahnen und Zertrümmerungssterne. Sitzber. (Wien) IIa, 146 (1937) S. 623.
[379] *Cantu, C.:* Microscope pour relevés microphotographiques. Mésure sur les trace nucléaires dans les émulsions photographique. Bull. Micr. Appl. [2] 6 (1956) S. 199.
[380] *Demers, P.:* Ionographie. Les Emulsions Nucléaires, Principes et Application. Montreal 1958.
[381] *Gottstein, K.:* Die Durchführung und Auswertung von Messungen in kernphotographischen Emulsionen. In: *Heisenberg, W.:* Kosmische Strahlen. Berlin 1953.
[382] – Measurement of the "Noise" of Different Types of Microscop Stages. Nuovo Cimento 12 (1954) S. 619.
[383] *Lattes, C.M.G.; Occhialini, G.P.S.; Powell, C.F.:* Observations on the tracks of slow mesons in photographic emulsions. I. Existence of mesons of different mass. Nature 160 (1947) S. 453; II. Origin of the slow mesons. Nature 160 (1947) S. 486.
[384] –, –, – A determination of the ratio of masses of π- and μ-Mesons by the method of grain counting. Proc. Phys. Soc. A 61 (1948) S. 173.
[385] *Meyer, P.:* Die photographische Emulsion in der Kernphysik. Naturwiss. 35 (1948) S. 369.
[386] *Occhialini, G.P.S.; Powell, C.F.:* The artificial production of mesons. Nature 161 (1948) S. 551.
[387] –, – Observations on the production of mesons by cosmic radiation. Nature 162 (1948) S. 168.
[388] *Powell, C.F.:* Further applications of the photographic method in nuclear physics. Nature 145 (1940) S. 155.
[389] – Freiballonflüge in großen Höhen. Naturw. Rdsch. 6 (1953) S. 397.
[390] *Teucher, M.:* Technik und Anwendung der Kernemulsionen. Ergebn. d. exakt. Naturwiss. 28 (1955) S. 407.

Literatur zu Abschnitt 6.1.9.

[391] *Abderhalden, E.:* Handb. d. biologischen Arbeitsmethoden. Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg 1923.
[392] *Bahrmann, E.; Urbach, E.:* Zum Dickenoptimum der Deckgläser für Mikropräparate. Feingerätetechnik 13 (1964) H. 11, S. 502.
[393] *Bracey, R.J.:* The aberrations of microscope objectives and their variations with small apertures from optimum working conditions. J. Roy. Micr. Soc., Ser. III. 72 (1952) H. 1, S. 1.
[394] *Freund, H.:* Handbuch der Mikroskopie in der Technik. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1957.
[395] *Gröbl, Th.:* Histologische Technik. Wien: Verlag W. Maudrich 1950.
[396] *Gurr, E.:* A practical manual of medical and biological staining techniques. 2. Ed. London 1956.
[397] – Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry. London, New York: Academic Press 1971.
[398] *Harders-Steinhäuser, M.:* Das Mikrotom und seine Anwendung. In: *H. Freund:* Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd. 1/1. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1957.

[399] *Harms, H.:* Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Kamp-Lintfort: Staufen-Verlag 1965.
[400] *Haug, H.:* Leitfaden der mikroskopischen Technik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1959.
[401] *Knöll, H.:* Zur Verwendung von Kapillaren mit rechteckigem Querschnitt in der Mikrokinematographie. Research Film 4 (1962) S. 375.
[402] *Lapina, G.N.; Zacharjevskij, A.N.:* Über Deckgläser für mikroskopische Präparate. Opt.-mech. Promyšlennostj (1958) H. 3, S. 17.
[403] *Loske, Th.:* Methoden der Textilmikroskopie. Stuttgart: Franckh'sche Verlagshandlung 1964.
[404] *Norris, K.P.:* Some observations on microscope coverglasses. J. Roy. Micr. Soc., Ser. III. 79 (1960/61) H.4, S. 287.
[405] *Oster, G.:* Physical Techniques in Biological Research. New York: Academic Press, Publishers 1955.
[406] *Otto, L.:* Mikrurgische Geräte und Verfahren. Z. med. Labortechnik 2 (1961) H. 1/2, S. 65.
[407] *Perfiliev, B. W.; Glave, D. R.:* Kapillarmethoden zur Untersuchung von Mikroorganismen. Moskau, Leningrad: Verlag der Akademie der Wissenschaften der UdSSR 1961.
[408] *Petry, G.:* Der Werdegang des histologischen Präparats. Leipzig: Verlag S. Hirzel 1944.
[409] *Pijper, A.; Kistner, A.:* Slides and cover glasses for dark-ground microscopy. J. Roy. Micr. Soc., Ser. III. 71 (1951) H. 2, S. 176.
[410] *Reumuth, H.; Loske, Th.:* Küvettenmikroskopie in Biologie und Technik. Mikroskopie (Wien) 17 (1962) H. 5/6, S. 149.
[411] *Roberts, D.C.; Trevan, D.J.:* A versatile microscope chamber for the study of the effects of evironmental changes on living cells. J. Roy. Micr. Soc., Ser. III. 79 (1959) S. 361.
[412] *Romeis, B.:* Mikroskopische Technik. 16. Aufl. München, Wien: R. Oldenbourg Verlag 1968.
[413] *Ruhenstroht-Bauer, G.:* Über elektrophoretische Untersuchungen von Zellen und ähnlichen Partikeln mit dem Zytopherometer. Zeiss-Mitt. Fortschr. Techn. Opt. 3 (1964) H. 7, S. 253.
[414] *Sartory, K.:* The effects of cover glass thickness on the spherical correction of objectives. The Microscope 7 (1948/49) Nr. 5, S. 122.
[415] *Sayk, J.:* Zytologische Aspekte zur instrumentellen Autosedimentation. Forsch. Fortschr. 41 (1967) H. 10, S. 293.
[416] *Schilling, V.:* Praktische Blutlehre. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1949.
[417] *Schulze, E.; Graupner, H.:* Anleitung zum mikroskopisch-technischen Arbeiten in Biologie und Medizin. 2. Aufl. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest & Portig K. G. 1960.
[418] *Schwoerbel, J.:* Methoden der Hydrobiologie. Stuttgart: Franck'sche Verlagshandlung 1966.
[419] *Setterington, R.:* The specification of a Standard microscopical cover-glass. J. Roy. Micr. Soc., Ser. III. 73 (1953) H. 2, S. 69.
[420] *Spinell, B.M.; Loveland, R.P.:* Optics of the object space in microscopy. J. Roy. Micr. Soc., Ser. III. 79 (1960) H. 1, S. 59.
[421] *Stobbe, H.:* Die Methodik im hämatologischen Laboratorium. I. Zählkammern. Z. med. Labortechnik 1 (1960) H. 2, S. 79.
[422] *Uhlig, M.:* Einfluß der Deckglasdicke und des n_d -Wertes der Deckgläser auf die sphärische Längsabstimmung bei Mikroskopobjektiven. Mikroskopie (Wien) 19 (1964) H. 5/6, S. 161.
[423] *Utermöhl, H.:* Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methode. Stuttgart: Mitt. Inter. Ver. Limnol. 9, Schweizerbarthsche Verlagshandlung 1958.
[424] *Walter, F.:* Das Mikrotom. Technisch-pädagogischer Verlag. Wetzlar: Scharfes Druckereien 1961.

Literatur zu Abschnitt 6.2.1.

[425] *Alpern, B.; Nomarski, G.:* Contribution à l'amélioration des méthodes d'examen microscopique et de classification des charbons. Bull. Soc. franc. Minér. Crist. 77 (1954) S. 905.
[426] *Ehrenberg, H.:* Die Auflichtmikroskopie. In: *H. Freund:* Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd. 1, Teil 2. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1960.
[427] *Harting, P.:* Das Mikroskop. Braunschweig: F. Vieweg & Sohn 1859.
[428] *Oettel, W.:* Grundlagen der Metallmikroskopie. Leipzig: Akad. Verlagsges. Geest & Portig K.G. 1959.
[429] – Das Köhlersche Beleuchtungsprinzip – 75 Jahre alt. Praktische Metallographie 12 (1968) S. 654.
[430] *Pepperhoff. W.:* Quantitative Auflichtmikroskopie mit Hilfe aufgedampfter Interferenzschichten. Arch. Eisenhüttenwes. 36 (1965) S. 941.
[431] –, *Pusch, R.:* Kontraststeigerung in der Auflichtmikroskopie durch reflexionserhöhende Aufdampfschichten. Z. wiss. Mikr. 65 (1961) S. 88.
[432] *Schade, K.H.; Klein, W.:* Unendlich-Optik, was bringt sie? Leitz-Mitt. Wiss. u. Techn., Bd. VI, Nr. 5, S. 185.
[433] *Stach, E.:* Kohlenanschliff-Mikroskopie mit Methylenjodid-Immersion. Brennstoff-Chemie 39 (1958) H. 1/2, S. 15.
[434] *Tensi, H.-M.:* Aus der historischen Entwicklung der Metallografie. In: *H. Freund:* Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik, Bd. III, Teil 1. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1968.

Literatur zu Abschnitt 6.2.2.

[435] *Benford, J.R.; Seidenberg, R.L.:* Phasecontrast-Microscopy for Opaque Specimens. J. O. S. A. 40 (1950) S. 314.

[436] *Beyer, H.:* Das Phasenkontrastverfahren in der Auflichtmikroskopie. Feingerätetechnik 4 (1955) S. 343.
[437] –, *Schöppe, G.:* Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen geometrischer und physikalischer Oberflächenstrukturen. Jenaer Jb. (1965) S. 31.
[438] *Cuckow, F. W.:* Phasen-Contrast in the Photomicrography of Metals. Nature 159 (1947) S.639.
[439] *Faasch, W.; Hein, G.; Koch, L.:* Über die Untersuchung von Metalloberflächen unter Anwendung des Lackabdruckverfahrens und des Phasenkontrastverfahrens. Metalloberfläche 4 (1950) S. 129.
[440] *Gabler, F.:* Das Phasenkontrastverfahren und seine Anwendung in der Auflichtmikroskopie. Mikroskopie 7 (1952) S. 43.
[441] – Ein neues Auflicht-Phasenmikroskop. Radex-Rdsch. (1952) S. 210.
[442] –, *Mitsche, R.:* Das Auflicht-Phasenkontrastmikroskop und seine Anwendung in der Metallo graphie. Arch. Eisenhüttenwes. 23 (1952) S. 145.
[443] *Jupnik, H.; Osterberg, H.; Pride, G.E.:* Phase-Microscopy withVertical Illumination. J. O. S. A. 38 (1948) S. 338.
[444] *Lean Mc, D.:* Phasecontrast-Microscopy in the Study of Metal-Surfaces. Metal-Treatment and Drop Forging (1951) S. 51.
[445] *Mitsche, R.:* Die Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in Berg- und Hüttenwesen. Radex-Rdsch. (1952) S. 216.
[446] *Mott, B. W.:* Metallurgical Aspects of Microscopy. Research 8 (1955) S. 307.
[447] *Perryman, E. C.; Lack, M.:* Phasecontrast-Metallography. Laboratory-Methods. Metallurgia 44 (1951) S. 97 u. 110.

Literatur zu Abschnitt 6.2.3.

[448] *Bachmann, L.; Sitte, P.:* Dickenbestimmung nach *Tolansky* an Ultradünnschnitten. Mikroskopie 13 (1958) S. 289.
[449] *Bertoci, U.; Noggle, T. S.:* Interference contrast employed to measure slops on metallographic specimens. Rev. Scient. Instr. 37 (1966) S. 1750.
[450] *Beyer, H.:* Interferenzmikroskopische Oberflächenuntersuchungen unter besonderer Berücksichtigung der Halbleitertechnik und Mikroelektronik. Feingerätetechnik 23 (1974) S. 416–422.
[451] *Bruce, C. F.; Thornton, B. S.:* Obliquity effects in interference microscopes. J. Scient. Instr. 34 (1957) S. 203.
[452] *Grube, W. L.; Rouze, S. R.:* Application of Two Beam Interference Microscope to the Study of Surfaces. J. O. S. A. 44 (1954) S. 851.
[453] *Illig, W.:* Oberflächenprüfung mit dem Interferenzmikroskop. Metalloberfläche A7 (1953) S. 97.
[454] *Jeglitsch, F.; Mitsche, R.:* Die Anwendung optischer Kontrastmethoden in der Metallographie. Radex-Rdsch. 3/4 (1967) S. 587.
[455] *Jegoroff, V. A.:* Les caracteristiques optiques des microscopes interférentiels pour l'évaluation quantitative de la rugosité des surfaces. Rev. polytechn. (Genf) 1234 (1966) S. 1103, 1105, 1107, 1109, 1111.
[456] *Kinder, W.:* Ein Mikrointerferometer nach *W. Linnik*. Zeiss-Nachr. (1937) S. 91.
[457] – Anwendung des Mikro-Interferometers nach *Linnik* zur Bestimmung der Gestalt einzelner Erytrozyten. Zeiss-Nachr. (1937) S. 100.
[458] *Kohaut, A.:* Das Interferenzmikroskop, ein vielseitiges Meßgerät. Z. f. angew. Phys. 4 (1948) S. 165.
[459] – Zur Praxis der Oberflächenprüfung mit dem Interferenzmikroskop. Werkstatt und Betrieb 86 (1953) S. 725.
[460] *Krug, W.; Lau, E.:* Die Äquidensitometrie, ein neues Meßverfahren für Wissenschaft und Technik. Feingerätetechnik 1 (1952) S 391.
[461] *Linnik, W.:* Ein Apparat für mikroskopisch-interferometrische Untersuchung reflektierender Objekte (Mikrointerferometer). C. R. Acad. Sci. U. R. S. S. 1 (1933) S. 18.
[462] *Mirau, A.:* Méthodes et appareils français de mesure du fini des surfaces. Rev. Universelle des Mines 11 (1955) S. 461.
[463] *Nomarski, G.; Weill, A. R.:* Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées. Rev. de Métallurgie 50 (1955), S. 121.
[464] *Perry, J. W.:* Surface Micro-Interferometry. Recent developments and description of new interferometers. Research 8 (1955) S. 255.
[465] *Rienitz, J.:* Ein Verfahren zur Verdoppelung der Meßgenauigkeit, Ermittlung des „stoffeigenen Phasensprungs" und Prüfung der Abdrucktreue in der Auflicht-Interferenzmikroskopie. II. Internationales Kolloqium an der Hochschule für Elektrotechnik Ilmenau 1957. S. 23.
[466] *Tolansky, S.:* Multiple-Beam Interferometrie of Surfaces and Films. Oxford, London 1948.
[467] – The Microstructure of Diamond Surfaces. London 1955.
[468] –, *Emara, S. H.:* Precision Multiple-Beam Interference Fringes with High Lateral Microscopic Resolution. J. O. S. A. 45 (1955) S. 792.
[469] *Zehender, E.:* Ein Interferenzverfahren zur Untersuchung rauher Oberflächen. Z. VDI 94 (1952) S. 456.

Literatur zu Abschnitt 6.2.4. und 6.2.5.

[470] *Berek, M.:* Ein Prisma für 90°-Ablenkung. Z. Instrumentenkunde 55 (1936) H. 1, S. 1.
[471] – Die anisotrope Aufhellung zwischen gekreuzten Nicols im Auflicht. Optik 2 (1947) S. 332.

[472] –, *Marx, H.:* Theorie einer Abwandlung der Methode von *J. MacCullagh* und *G. G. Stokes* zur Analyse elliptisch polarisierten Lichts für den Sonderfall langgestreckter Schwingungsellipsen. Optik 3 (1948) S. 444.
[473] *Bowie, S. H. U.; Taylor, K.:* A System of Ore Mineral Identification. Mining Mag. 96 (1958) S. 337 u. 265.
[474] *Cameron, E. N.:* Ore Microscopy. New York: Wiley & Sons 1961.
[475] – Optical Symmetry from Reflectivity Measurements. Amer. Mineral. 48 (1963) S. 1070.
[476] *Cissarz, A.:* Reflexionsmessungen an absorbierenden Kristalle. Z. Kristallogr. 82 (1932) S. 438.
[477] *Demirsoy, S.:* Die Entwicklung des Mikroskop-Photometers mit besonderer Berücksichtigung der Reflexionsmessung. Zeiss-Mitt. 4 (1967) S. 254.
[478] *Ehrenberg, H.:* Die Messung der Reflexionsindikatrix von Erzen mit dem U-Tisch. Fortschr. Mineral. 29/30 (1952) S. 399.
[479] – Reflexionsmessungen in der Erzmikroskopie. Z. wiss. Mikr. 66 (1964) S. 32.
[480] *Falkenberg, W.; Hahne, B.; Seyfarth, H.-H.:* Kombinierte Untersuchungsmöglichkeit zur Phasenanalyse an mikroskopischen Präparaten. Jenaer Rdsch. 19 (1974) S. 230–231.
[481] *Foster, L. V.:* A Polarizing Vertical Illuminator. J. Opt. Soc. Amer. 28 (1938) S. 124.
[482] *Foster, F. G.:* Magnetography – The Microscopy of Magnetism. Bell. Lab. Rec. 35 (1957) S. 175.
[483] *Gabler, F.:* Becke-Linie, Schneider-Höhn-Linie und Phasenkontrast. N. Jb. Miner., Moh. (1952) S. 253.
[484] *Heide, F.:* Bittersche Streifen auf Cohenit und Kamazit. Naturwiss. 53 (1966) S. 499.
[485] *Kötter, K.:* Die mikroskopischen Reflexionsmessungen mit dem Photo-Multiplier und ihre Anwendung auf die Kohleuntersuchung. Brennstoff-Chemie 41 (1960) S. 263.
[486] *Mott, B. W.; Haines, H. R.:* The Effect of Strain in Objective Lenses. Proc. Phys. Soc. 66 (1953) S. 302.
[487] *Pepperhoff, W.:* Sichtbarmachung ferromagnetischer Elementarbereiche im polarisierten Licht. Arch. Eisenhüttenwes. 34 (1963) S. 767.
[488a] *Piller, H.:* Influence of light reflection at the objective in the quantitative measurement of reflectivity with the microscope.
[488b] *Short, M. N.:* Microscopic Determination of the Ore Minerals. Bulletin 914, U.S. Geol. Survey, 2[nd] Ed. 1948.

Literatur zu Abschnitt 6.2.6.

[489] *Attinger, M. C.:* Mesure de la dureté de petits cylindres. Bull. annu. Soc. suisse Chronom. 2 (1946) S. 321.
[490] *Bückle, H.:* Progress in micro-indentation hardness testing. Metallurg. Rev. 4 (1959) S. 49.
[491] – Mikrohärteprüfung und ihre Anwendung. Stuttgart: Berliner Union 1965.
[492] *Eisenkolb, F.:* Einführung in die Werkstoffkunde. Bd. 4: Nichteisenmetalle. Berlin: VEB Verlag Technik 1960.
[493] *Kaufmann, S.:* Mikrohärtemessung an zylindrischen Fasern und Elementarfäden. Faserforschung und Textiltechnik 20 (1969) S. 197.
[494] *Mott, B. W.:* Die Mikrohärteprüfung. Stuttgart: Berliner Union 1956.
[495] *Oettel, W.:* Über Anforderungen an die Optik und an die Probenvorbereitung bei der Bestimmung der Mikrohärte. Feingerätetechnik 11 (1962) H. 2, S. 68.
[496] *Semlitsch, H.; Bergsman, B.:* Mikrohärteprüfung an metallischen Objekten bei Raum- und höherer Temperatur. In: *H. Freund:* Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd. III, Teil 2. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1969.
[497] *Tertsch, H.:* Methoden mikroskopischer Härteprüfung. In: *H. Freund:* Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd. I, Teil 2. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1960.

Literatur zu Abschnitt 6.2.7.

[498] *Arndt, R.; Hillnhagen, E.:* Spezielle Verfahren zur metallografischen Untersuchung von Hartmetallen. Praktische Metallografie 9 (1972) S. 309.
[499] *Barteld, K.:* Metallografische Qualitätskontrolle in einem Edelstahlwerk. Praktische Metallografie 11 (1974) S. 575.
[500] *Bartosiewicz, L.:* Ein neues Verfahren für die Herstellung von fehlerfreien Pulverpräparaten. Praktische Metallografie 10 (1973) S. 144.
[501] *Beckert, M.; Klemm, H.:* Handbuch der metallographischen Ätzverfahren. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie 1962.
[502] *Bernst, R.:* Erfahrungen mit dem elektrolytischen Poliergerät Elypovist und erste Hinweise über das Polieren mit Diamantpasten eigener Produktion. Jenaer Rdsch. (1963) H, 1, S. 58.
[503] – Der Einfluß einer metallografischen Prüfflächenvorbereitung auf die Mikrohärte. Praktische Metallographie 2 (1965) S. 162.
[504] *Bühler, H. E.:* Ein Beitrag zur Gefügeentwicklung durch Interferenz-Aufdampfschichten. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 672.
[505] *De Ferri:* Metallographie. Bd. I: Grundlagen der Metallographie. Brüssel: Presses Académiques Européennes, S. G. 1966; Bd. II: Gefüge der Stähle. Düsseldorf: Verlag Stahleisen mbH 1966.
[506] *Dieser, K.:* Beitrag zur zerstörungsfreien metallografischen Untersuchung großer Bauteile. Praktische Metallografie 11 (1974) S. 441.
[507] *Feurer, U.; Schaller, E.:* Elektrolytisches Vibra-

tionspolieren von Kupfer. Praktische Metallografie 10 (1973) S. 9.
[508] *Hanemann, H.; Schrader, A.:* Ternäre Legierungen des Aluminiums. Düsseldorf: Verlag Stahleisen mbH 1952.
[509] *Herff, K.; Roeder, E.:* Untersuchung und Messung dünner Schichten. Praktische Metallografie 9 (1972) S. 615.
[510] *Hilbert, F.:* Das katodische Vakuumätzen als metallografisches Verfahren. Neue Hütte 7 (1962) S. 368 u. 416.
[511] *Jacquet, P. A.:* Le Polissage Elektrolytique des Surfaces Métalliques et ses Applications. T. I., Saint-Germain-en-Laye: Editions Métaux 1948.
[512] – Das elektrolytische Polieren von Metallen. Metall 8 (1954) S. 449.
[513] *Just, J.; Altgeld, W.:* Elektrolytisch-mechanisches Polieren von Eisen-Kohlenstoff-Legierungen. Metallkunde 52 (1961) S. 410.
[514] *Kronenberg, K.-J.; Feldmann, D.:* Die Anwendung veränderlicher, hoher Magnetfelder bei Untersuchungen magnetischer Bereichsstrukturen. Praktische Metallografie 11 (1974) S. 140.
[515] *Knuth-Winterfeldt, E.:* Schnelle elektrolytische Methode zum Polieren von Metalloberflächen. Stahl und Eisen 61 (1941) S. 777.
[516] *Lihl, F.; Mayer, H.:* Untersuchungen über die Eindringtiefe der Verformung bei der Herstellung metallografischer Schliffe. Metallkunde 51 (1960) S. 186.
[517] *Lüdering, H.:* Das elektrolytisch-potentiostatische Ätzen. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 650.
[518] *Ondracek, G.; Spieler, K.:* Gasätzen – ein neues Kontrastierungsverfahren in der Gefügepräparation. Praktische Metallografie 10 (1973) S. 324.
[519] *Pejsá, R.; Hellriegel, W.:* Metallografische Präparation in den „Heißen Zellen“. Praktische Metallografie 11 (1974) S. 705.
[520] *Pepperhoff, W.:* Gefügeentwicklung durch Interferenz-Aufdampfschichten. Arch. Eisenhüttenwes. 32 (1961) S. 269 u. 651.
[521] *Petzow, G.; Gessner, L.; Hölscher, D.:* Über die Schliffherstellung nach dem Vibrationsverfahren. Metallkunde 53 (1962) S. 535.
[522] *Rehwald, G.:* Eine neue Schleif- und Poliermaschine für die Anfertigung von Erz- und Metallanschliffen. Fortschr. Mineral. 31 (1952) S. 17.
[523] *Reinacher, G.:* Metallografische Präparation von Edelmetallproben durch elektrolytisches Wischpolieren. Metallkunde 48 (1957) S. 162.
[524] – Versuche zum Ersatz des Schleifens und Polierens von Edelmetall-Schliffen durch Mikrotom-Schneiden mit Diamantmessern. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 623.
[525] *Rexer, J.; Vogel, M.:* Erfahrungen beim Ionenätzen mit dem Vakuum-Katodenätzgerät der Firma Numec. Praktische Metallographie 5 (1968) S. 361.
[526] *Robusch, G.; Engler, G.:* Nachweis von Restaustenit mit Hilfe aufgedampfter Interferenzschichten. Praktische Metallografie 9 (1972) S 553.
[527] *Schatt, W.:* Neuere Untersuchungen zur Schraffurätzung. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 657.
[528] –, *Worch, H.:* Grundlagen der metallographischen Gefügeentwicklung in Lösungen. Neue Hütte 14 (1969) S. 685 bis 690.
[529] *Schrader, A.:* Ätzheft. Berlin: Verlag Bornträger 1957.
[530] *Schumann, H.:* Metallographie. Leipzig: VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie 1967.
[531] *Schwaab, P.; Schüller, H.-J.:* Die Anwendung der Ionenätzung in der Metallographie. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 742.
[532] *Spies, H.-J.; Preißler, E.; Münch, G.:* Elektrolytisches Naßschleifen metallografisch schwer bearbeitbarer hochlegierter Cr-Ni-Stähle. Neue Hütte 19 (1974) S. 179.
[533] *Vanderwilt, J. W.:* Improvements in the polishing of ores. Econ. Geol. 23 (1928) S. 292.

Literatur zu Abschnitt 7.

[534] *Czapski, G.; Gebhard, W.:* Das stereoskopische Mikroskop nach Greenough und seine Nebenapparate. Z. wiss. Mikr. XIV (1897) S. 289.
[535] *Freund, H.:* Das Stereodoppelmikroskop nach *Greenough*, eine interessante Weiterentwicklung für die mikroskopische Chirurgie und Intravitalmikroskopie. Leitz-Mitt. 3 (1965) S. 117.
[536] *Lehr, A.; Bonnke, H.:* Der Mikrostereoprojektor PLASTIVAL 50 aus Jena. Jenaer Rdsch. 19 (1974) S. 219–222.
[537] –: Hinweise zum optimalen Einsatz der Stereomikroskope. Feingerätetechnik 24 (1975) S. 145 bis 149.
[538] *Minus, F. A.:* Optical design and the Zoom-Stereoscopic Microscope. Lab. Pract. (1964) S. 1106.
[539] *Pawelski, W. J.; Gliem, H.:* Die Photospaltleuchte des VEB Carl Zeiss JENA in Forschung und Praxis – ein Erfahrungsbericht. Jenaer Rdsch. 19 (1974) S. 111–116.
[540] *Rohr, M. v.:* Die binokularen Instrumente. Berlin 1920.
[541] *Weinhold, H.:* Die Operationsmikroskope 210 und 220 des VEB Carl Zeiss JENA. Jenaer Rdsch. 20 (1975) S. 31–33.
[542] – Die Kolposkope 110 und 120 des VEB Carl Zeiss JENA. Jenaer Rdsch. 20 (1975) S. 34–36.

Literatur zu Abschnitt 8.1. und 8.2.

[543] *Bergner; Gelbke; Mehliss:* Einführung in die praktische Mikrofotografie. Halle: VEB Fotokinoverlag 1961.
[544] *Diedrich, U.:* Methoden der Film- und Photoanalyse. Bd. 1: Photoanalyse. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1966.

[544a] *Федин, Л.А.; Барский, И.Я.*: Микрофотография. Москва „Наука" 1971 г.
[545] *Gander, R.*: Rezepte zur Mikrophotographie für Mediziner und Biologen. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg 1968.
[546] *Guex, P.*: Le procédé Polaroid et ses applications en photomicrographie. Mesures (1963) H. 309, S. 213.
[547] *Hauser, F.*: Die Entwicklung mikrophotographischer Apparate bei der Firma Zeiss in dem ersten Jahrhundert ihres Bestehens. Jenaer Jb. (1952).
[548] *Illgen*: Elektromagnetisch betätigter Verschluß, vorzugsweise für die Mikrofotografie. DWP 37557, 1960.
[549] *Michel, K.*: Die Mikrophotographie. Bd. X: „Die wissenschaftliche und angewandte Photographie". Wien, New York: Springer-Verlag 1957.
[550] *Mutter, E.*: Die Technik der Negativ- und Positiv-Verfahren. Bd. V: „Die wissenschaftliche und angewandte Photographie". Wien, New York: Springer-Verlag 1955.
[551] – Farbphotographie – Theorie und Praxis. Bd. IV: „Die wissenschaftliche und angewandte Photographie". Wien, New York: Springer-Verlag 1967.
[552] *Weidel, G.*: Makroaufnahme – Mikroaufnahme? Bild und Ton 6 (1953) H. 8.
[553] – Mikrofotografie mit der Vertikalkamera 9 cm × 12 cm. Zeiss-Nachr. 8 (1968/69) S. 186.
[554] – Eine Belichtungsautomatik für die Mikrofotografie mit der Aufsetzkamera. Jenaer Rdsch. 8 (1963) S. 104.

Literatur zu Abschnitt 8.3. bis 8.7.

[555] *Diedrich, U.*: Methoden der Film- und Fotoanalyse. Band 2: Filmanalyse. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1967.
[556] *Fendler, E.*: Vergleich der Güte von Fernsehbildern. Kinotechnik 13 (1959) H. 5, S. 33 und 34.
[557] *Frenk, H.*: Möglichkeiten und Grenzen der Fernsehmikroskopie. Radio-Mentor 11 (1960) S. 887.
[558] *Gabler, F.*: Ein Beitrag zur Fernsehmikroskopie. Microchimica Acta (1956) S. 638.
[559] *Köhler, A.*: Die Leistung der Projektionsapparate, insbesondere des Projektionsmikroskops. Naturwiss. 23 (1935) S. 27.
[560] – Über neue Systeme für Mikrophotographie und Mikroprojektion. Z. Instrkde. 55 (1935) S. 407.
[561] *Kuhl, W.*: Vom Forschungsfilm zur Veröffentlichung. Mikroskopie 7 (1952) S. 296.
[562] *Michaelis, A.R.*: Research Films in Biology, Anthropology, Psychology and Medicine. New York: Academic Press Inc. 1955.
[563] *Otto, L.*: Mikroprojektion, Feingerätetechnik 3 (1954) H. 3, S. 151.
[564] *Rose, G.G.*: Cinemicrography in Cell Biology. New York: Academic Press Inc. 1963.
[565] *Weidel, G.*: Das Fernsehmikroskop aus Jena. Jenaer Rdsch., Messesonderheft (1964) S. 43.
[566] –: Mikroprojektion – Geräte und Methoden. Bild und Ton 22 (1969) H. 9, S. 277.
[567] –: Mikrokinematografie. Bild und Ton 24 (1971) H. 1/2, S. 5.

Literatur zu Abschnitt 9.

[567a] *Bach, G.*: Über die Bestimmung von charakteristischen Größen einer Kugelverteilung aus der Verteilung der Schnittkreise. Z. wiss. Mikr. 65 (1963) S. 285.
[568] *Batel, W.*: Einführung in die Korngrößenmeßtechnik. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer-Verlag 1964
[569] *Behringer, C.A.*: Untersuchungen zur quantitativen Mikroskopie von Drogenpulvern. Promotionsarbeit, Zürich 1963.
[570] *Benarie, M.*: Détermination de la limite inférieure de comptage dans une granulométrie microscopique. Rev. d'Opt. 45 (1966) S. 55.
[571] *Black, J.F.*: Scanned-Laser Microscope for Photoluminescence Studies. Appl. Opt. 11 (1972) S. 1553.
[572] *Bockstiegel, G.*: Eine einfache Formel zur Berechnung räumlicher Korngrößenverteilungen aus durch Linearanalyse erhaltenen Daten. Metallkunde 57 (1966) S. 647.
[573] *Burrels, W.*: Industrial Microscopy in Practice. London 1961.
[574] *Cadle, R.D.*: Particle Size Determination. New York, London 1955.
[575] *Chamot, E.M.; Mason, C.W.*: Handbook of Chemical Microscopy. New York, London 1958.
[576] *Charman, W.N.*: Some Experiments Concerning the Limitations and Errors in Size Measurements of Small Objects by Visual Microscopy. J. Roy. Micr. Soc. 82 (1963) S. 81.
[577] *Chayes, F.*: Petrographic Analysis by Fragment Counting. Econ. Geol. 39 (1944) S. 484; 40 (1945) S. 517.
[578] – The Theory of Thin-Section Analysis. Journ. Geol. 62 (1954) S. 92.
[579] – Petrographic Modal Analysis. New York, London 1956.
[580] *Cheng, G.C. et al.*: Pictoral Pattern Recognition. Washington 1968.
[581] *Delesse, A.*: Procédé méchanique pour determiner la composition des roches. Ann. mines 13 (1848) S. 379.
[582] *Dell, H.A. et al.*: Ein Gerät zur Zählung mikroskopischer Teilchen und zur Bestimmung ihrer Korngrößenverteilung. Philips' Techn. Rdsch. 22 (1960/61) S. 1.

[583] *Diergarten, H.:* Gefügerichtreihen im Dienste der Werkstoffprüfung in der stahlverarbeitenden Industrie. Düsseldorf 1951.

[584] *Dörfler, G.:* Sequence Analysis, a New Method for the Quantitative Determination of the Arrangement of Phase in Opaque Samples in Stereology. Proc. 2nd Internat. Congr. for Stereology in Chicago, Ed. *H. Elias*, Berlin, Heidelberg, New York 1967, S. 23.

[585] – Ein flexibles System zur stereometrischen Analyse mittels Lichtmikroskop, Elektronenmikroskop und Elektronensonde. Praktische Metallographie 6 (1969) S. 144.

[586] *Dyson, J.:* Precise Measurement by Image Splitting. J. Opt. Soc. Amer. 50 (1960) S. 754.

[587] *Endter, F.; Gebauer, H.:* Ein einfaches Gerät zur statistischen Auswertung von mikroskopischen bzw. elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Optik 13 (1956) S. 97.

[588] *Exner, H. E.:* Die mikroskopische Bestimmung von räumlichen Korngrößenverteilungen in undurchsichtigen Stoffen. Praktische Metallographie 3 (1966) S. 334.

[589] – Modellversuche zu den Umrechnungsverfahren... Metall 21 (1967) S. 431.

[590] *Fischmeister, H.:* Verfahren und Apparate der quantitativen Metallographie. Praktische Metallographie 2 (1965) S. 251.

[591] *Fröhlich, H.:* EPIQUANT – ein neues Gerät des VEB Carl Zeiss JENA zur automatischen Gefügeanalyse. Jenaer Rdsch. 19 (1974) S. 85.

[592] *Gebelein, H.:* Die Bedeutung des mit dem Dispersometer gemessenen statistischen Durchmessers. Chemie-Ing.-Techn. 30 (1958) S. 594.

[593] *Glagolev, A. A.:* Über geometrische Methoden der quantitativen mineralogischen Analyse von Gesteinen (russ.). Trudy Inst. Prikl. Min. (Leningrad) 59 (1933) S. 7.

[594] – Quantitative Analysis with the microscope by the point method. Engr. Min. Jour. 135 (1934) S. 399.

[595] *Greif, H.:* Volumenanteilbestimmung an Planschliffen nach dem Punktzählverfahren. Silikattechnik 16 (1965) S. 121.

[596] *Grethen, E.:* Der Einfluß einer Chromsäureätzung auf die Meßergebnisse des Quantimet. Prakt. Metallografie 5 (1969) S. 672.

[597] *Gröbler, B.:* Zur Verwendung einiger statistischer Korngrößendefinitionen bei der mikroskopischen Teilchengrößenanalyse. Silikattechnik 20 (1969) S. 189ff. u. 275ff.

[598] *Gurland, J.:* A Study of Contact and Contiguity of Dispersions in Opaque Samples. In Stereology, Proc. 2nd Internat. Congr. for Stereology in Chicago, Ed. *H. Elias*, Berlin, Heidelberg, New York (1967) S. 250.

[599] *Haenel, St.; Trepte, P.:* Einrichtung zur Gewinnung kreisförmiger Merkmale aus Bildern. Wirtschaftspatent DDR Nr. 97074.

[600] *Haug, H.:* Die Treffermethode, ein Verfahren zur quantitativen Analyse im histologischen Schnitt. Z. Anat. Ent. Geschichte 118 (1955) S. 302.

[601] *Hawskley, P. G. W.:* Theory of particle sizing and counting by track scanning. Brit. J. appl. Phys., Suppl. 3 (1954) S. 125.

[602] *Hennig, A.:* Das Problem der Kernmessung. Eine Zusammenfassung und Erweiterung der mikroskopischen Meßtechnik. Mikroskopie 12 (1957) S. 174.

[603] – Kritische Betrachtungen zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie. Werkzeitschrift Carl Zeiss, Oberkochen (1958) H. 30.

[604] *Heyn, E.:* Short reports from the metallurgical... Metallographist 6 (1903) S. 39.

[605] *De Hoff, R. T.:* The Relationship between ellean Surface Curvature and the Stereologic Counting Measurements. Proc. 2nd Intern. Congr. for Stereology in Chicago, Ed. *H. Elias*, Berlin, Heidelberg, New York (1967) S. 95.

[606] *Holmes, W. S.:* Automatic Photointerpretation and Target Location. Proc. IEEE 54 (1966) S. 1679.

[607] *Hörnsten, A.:* A method and set of apparatus for mineralogic-granulometric analysis with a microscope. Bull. Geol. Inst. Uni. Uppsala 38 (1960) S. 105.

[608] *Ingram, M.; Preston, K. jr.:* Automatic Analysis of Blood Cells. Scientific American, November (1970) S. 72.

[609] *Irani, R. R.; Callis, C. F.:* Particle Size: Measurement, Interpretation and Application. New York, London 1963.

[610] *Ivanickij, G. R.; Litinskaja, L. L.; Šichmatova, C. L.:* Automatische Analyse von Mikroobjekten (russ.). Moskau 1967.

[611] *Jankowski, B.:* Beitrag zur mikroskopischen Bestimmung der Kornverteilung an Pulverpräparaten. Silikattechnik 13 (1962) S. 209.

[612] *Jarvis, R. A.:* Computer controlled scanning optical microscope. Microscope 22 (1974) S. 247.

[613] *Jesse, A.:* Bibliography an automatic image analysis. Microscope 20 (1974) S. 89.

[614] *Ledley, R. S.:* Pattern recognition studies in the biomedical sciences. Proc. Spring Joint Comp. Conf. (1966) S. 411.

[615] – Analysis of Cells. IEEE Trans. C–21 (1972) S. 740.

[616] *Loquin, M.:* Les erreurs de mésure au microscope. Bull. de Micr. 6 (1956) S. 106.

[617] *Lord, G. W.; Willis, T. F.:* Calculation of air Bubble Size Distribution from Results of a Rosival Traverse of Areated Concrete. ASTM Bull. 177 (1951) S. 56.

[618] *Martensson, H.; Persson, S.:* Ein Gerät zum automatischen Schleifen und Polieren metallographischer Proben. Prakt. Metallografie 7 (1970) S. 691.

[619] *Martin, H.:* Messung definierter Mikrovolumina... Mikroskopie 30 (1974) S. 287.

[620] *May, K.R.:* The Cascade Impactor. An Instrument for Sampling Coarse Aerosols. J. Scient. Instr. 22 (1945) S. 187.

[621] *Mayhew, T.M.; Cruz Orive, L.M.:* Caveat on the use of Delesse principle of areal analysis for estimating component volume densities. J. of Microscopy 102 (1974) S. 195.

[622] *Mendelsohn, M.L. et al.:* Digital Transformation and Computer Analysis of Microscopic Images. In: Advances in Optical and Electron Microscopy 2 (1968) S. 77. Hrsg. *Barer, R.*; *Cosslett, V.E.*; London, New York.

[623] *Metzler, H.; Nitsche, D.:* Schliffherstellungsmethoden für poröse Preßlinge und Sinterteile auf Eisenbasis zur vollautomatischen Gefügeanalyse. Prakt. Metallografie 9 (1972) S. 408.

[624] *Meyer, E.W.; Wooding, M.:* A method of preparing a sample for microscopical scanning and its application to cervical cytology. Microscope 19 (1971) S. 327.

[625] *Mitsche, R.; Grabner, A.:* Das Korngrößen- und Gefügeokular nach Mitsche-Reichert. Mikroskopie 8 (1953) S. 52.

[626] *Mönch, S.; Exner, H.E.:* Bestimmung der Korngröße und Korngrößenverteilung. Metallkunde 59 (1968) S.356.

[627] *Müller, G.:* Methoden der Sediment-Untersuchung. Stuttgart 1964.

[628] *Münzer, H.; Schneiderhöhn, P.:* Das Sehnenschnittverfahren. Heidelberg: Beitr. Min. und Petrol. 3 (1953) S. 456.

[629] *Patterson, C.; Cawood, W.:* The Determination of Size Distribution in Smokes. Trans. Faraday Soc. 32 (1936) S. 1084.

[630] *Pidgeon, F.; Dodd, C.:* Die Verwendung des Mikroskops zum genauen Messen der Oberfläche kleiner Teilchen. Peintures, Pigments, Vernes 29 (1953) S. 818.

[631] *Pluta, M.:* Stereoscopic Method of Depth Measurement under the Microscope. Optica Applicata 3 (1973) S. 31.

[632] *Rosiwal, A.:* Über geometrische Gesteinsanalysen usw. Verh. d. K. K. Reichsanstalt Wien (1898) S. 134.

[633] *Saltykov, S.A.:* Stereometrische Metallographie. Leipzig 1975.

[634] *Schrader, M.:* Durchlichtmikroskopische Messung der Lackschichtdicke auf dünnen Kupfer-Lackdrähten. Mikroskopie 21 (1966) S. 249.

[635] *Schulze, D.:* Über eine Meßschablone zur statistischen Auswertung licht- oder elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Einzelteilchen. Exp. Technik d. Physik 4 (1956) S. 204.

[636] Second International Joint Confer. Don Pattern Recognition, 13.–15.8.1974. Copenhagen, Denmark, Proceedings: IEEE-Catalog Number 74 CH 885–4 C.

[637] *Serra, J.:* Theoretische Grundlagen des Leitz-Textur-Analyse-Systems. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. Suppl. I (1973) S. 125.

[638] *Simon, H.*, Hrsg.: Automatische Bildverarbeitung in Medizin und Biologie. Dresden 1975.

[639] *Sitte, H.:* Morphometrische Untersuchungen an Zellen. In: Quant. Methoden d. Morphol. Hrsg. *Weibl, E.R.; Elias, H.*, Berlin, Heidelberg, New York 1967, S. 165.

[640] *Smirnow, N.W.; Dunin-Barkowski, I.W.:* Mathematische Statistik in der Technik. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1963.

[641] *Smith, C.S.; Guttmann, L.:* Measurement of Internal Boundaries in Three-Dimensional Structures by Random Sectioning. Trans. AIME, J. of Metals 5 (1953) S. 81.

[642] *Timbrell, V.:* A Method of Measuring and Grading Microscopic Spherical Particles. Nature 170 (1962) S. 318.

[643] *Waelsch, J.H.:* Die Messung mikroskopischer Objekte mit Hilfe eines Fadenkreuzschenkels des Okularschraubenmikrometers. Z. med. Labortechnik 8 (1967) S. 178.

[644] *Waldow, D.E. et al.:* New Detection Systems for the Quantimet 720. Microscope 20 (1972) S. 183.

[645] *Watson, H.H.; Mulford, D.F.:* A particle-profile test strip for assessing the accuracy of sizing irregulary shaped particles with a microscope. Brit. J. appl. Phys., Suppl. 3 (1954) S. 105.

[646] *Weibl, E.R.; Elias, H.:* Quantitative Methoden der Morphologie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag 1967.

[647] *Weinstein, W.:* Images of incoherently illuminated bright and opaque discs. J.O.S.A. 45 (1955) S. 1006.

[648] *Weissenburger, G.:* Zur Integrationsanalyse. Dipl.-Arbeit Inst. Mathemat. Statistik. Leipzig 1961.

[649] *Welford, W.T.:* Sizing and Counting Small Particles by the Microscope. Times Science Review No. 40 (1961) pp. 6 u. 9.

[650] – The Mach Effect and the Microscope. In: Advances Opt. Electr. Micr. Ed. *R. Barer; V.E. Cosslett* 2 (1968) S. 41.

[651] *Werner, L.:* Über die Kapillarlängenbestimmung nach *Blinkov* und *Mioseev* am Fadenmodell. Z. f. mikr. anat. Forschg. 74 (1966) S. 321.

[652] *Wied, G.L. et al.:* Automatic Analysis of Cell Images by TICAS. In: Automated Cell Identification and Cell Sorting, Ed. *Wied, G.L.; Bahr, G.F.*, New York, London (1970) S. 195.

[653] *Zimmer, H.G.:* Automatische Analyse mikroskopischer Bilder. Opton Information 2 (1971) S. 17.

Literatur zu Abschnitt 10.

[654] American Institute of Physics: Temperature, its measurement and control in science and

industry. Vol. I. New York: Reinhold Publishing Corporation 1941.
[655] – Temperature, its measurement and control in science and industry. Vol. II. New York: Reinhold Publishing Corporation 1955.
[656] – Temperature, its measurement and control in science and industry. Vol. III, Parts, 1, 2 und 3. New York: Reinhold Publishing Corporation 1962.
[657] *Beyer, H.:* Handbuch der Mikroskopie. Berlin: VEB Verlag Technik 1973, S. 627.
[658] *Brandstaetter, F.; Mitsche, R.; Gabler, F.:* Kombination des Hochtemperaturmikroskops mit einer Magnetsonde. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4 S. 710–715.
[659] *Brock, T. W.:* A hot-stage petrographic microscope for glass research. J. Amer. Cer. Soc. 45 (1962) S. 5–7.
[660] *Calvo, F. A.; Revuelta, A.:* Welding metallurgy of steels. Progress Report Nr. 1 (1961). Instituto de la Soldadura, Madrid.
[661] –, – *Mompéan, L.:* Welding metallurgy of steels. Progress Report Nr. 2 (1962). Instituto de la Soldadura, Madrid.
[662] *Cech, R. E.:* A high-low temperature microscope stage. Rev. Scient. Instr. 21 (1950) S. 747–749.
[663] *Clothier, W. C.:* Microscope for use at temperatures near −190°C. J. Scient. Instr. 44 (1967) S. 535 u. 536.
[664] *Conroy, A. R.: Robertson, J. A.:* Controlled atmosphere hot stage. Glass Ind. 44 (1963) S. 76 bis 79, 102–104, 139–143, 175–177.
[665] *Crisler, J. P.:* Controlled atmosphere microscopy. Microscope 14 (1963–1965) S. 152–155.
[666] – *Hecht-Crisler, M.; Brinckman, F. E.:* Controlled atmosphere microscopy. Proc. Roy. Micr. Soc. 1 (1966) S. 161.
[667] *Dichtl, H. J.; Jeglitsch, F.:* Kombination der Hochtemperaturmikroskopie mit der Differentialthermoanalyse. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 716–722.
[668] *Dodd, J. G.:* A simple high-temperature hot stage for controlled temperatures to 2000°C. Microscope 14 (1963 bis 1965) S. 302–305.
[669] Thermoelektrische Kühlelemente. Druckschrift des VEB Halbleiterwerk Frankfurt (Oder) 1967.
[670] Mikro-Heiztisch BOETIUS mit Spezialmikroskop. Druckschrift des VEB Analytik Dresden.
[671] Erhitzungsmikroskope. Druckschrift 73-3e der E. Leitz GmbH, Wetzlar.
[672] Heiz- und Kühltisch 80 mit automatischer Thermoregulierung. Druckschrift 515-8c der E. Leitz GmbH, Wetzlar.
[673] Mikroskop-Heiztisch 350. Druckschrift 515-33a der E. Leitz GmbH, Wetzlar.
[674] Mikroskop-Heiztisch 1350. Druckschriften 513-74R u. 515-73 der E. Leitz GmbH, Wetzlar.
[675] Kältegeräte und Pyrolux II. Druckschriften des VEB Prüfgerätewerk Medingen.
[676] SPERMOTHERM und BIOTHERM. Druckschriften der C. Reichert Optische Werke, Wien.
[677] THERMOPAN. Druckschrift der C. Reichert Optische Werke, Wien.
[678] Inverted type biological microscopes-Model MiC 3 series. Druckschrift 44-1-4T der Union Optical Co., Tokyo.
[679] High temperature microscope Model HM-4. Druckschrift der Union Optical Co., Tokyo.
[680] Peltier-Batterien. Druckschrift der VALVO GmbH, Hamburg.
[681] *Eder, F. X.:* Moderne Meßmethoden der Physik. Teil II: Thermodynamik. Berlin: VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften 1956.
[682] *Emons, H.-H.; Keune, H.; Seyfarth, H. H.:* Chemische Mikroskopie. Eine Einführung in Theorie und Praxis mikroskopischer Untersuchungsmethoden. Leipzig: VEB Deutscher Verlag der Grundstoffindustrie 1973.
[683] – *Hahne, B.; Seyfarth, H.-H.:* Mikroskopischphasenanalytische Untersuchungsmöglichkeiten nichtbeständiger Substanzen am Beispiel anorganischer Salze. Jenaer Rdsch. 19 (1974) H. 4, S. 223–229.
[684] *Engel, F.:* Das Polarisations-Erhitzungsmikroskop bei der Untersuchung von Glas-Metall-Verbindungen. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. I (1960) H. 4 S. 136–139.
[685] *Engel, H. J.; Zerbst, E.:* Untersuchungen zur Präparattemperatur auf Mikroskopheiztischen. Z. wiss. Mikr. 64 (1960) S. 384–394.
[686] *Endell, K.:* Über ein neues Erhitzungsmikroskop für hohe Temperaturen mit synchroner Nicoldrehung. Z. Kristallogr. LVI (1920) S. 191–193.
[687] *Exner, G.:* Meß- und Einbaufehler bei Thermoelementen. Silikattechnik 3 (1952) S. 573 u. 574.
[688] *Feltham, P.:* A simple camera for the study of plastic deformation at elevated temperatures. Proc. Roy. Micr. Soc. 1 (1966) S. 147.
[689] *Freund, H.:* Die Hochtemperaturmikroskopie, ihre Geschichte, Entwicklung und Anwendung. Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd. I, Teil 2, S. 537–554. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1960.
[690] *Gobrecht, H.; Nelkowski, H.; Schlegelmilch, R.:* Anordnung zur Mikroskopie bei sehr tiefen Temperaturen. Z. f. angew. Phys. XX (1966) S. 194 u. 195.
[691] *Grabar, D. G.:* Thermal-optical effects in acrylic fibres. Microscope 14 (1964) S. 209–214.
[692] *Gugel, E.; Czedik-Eysenberg, F.:* Aussagen und Anwendungsmöglichkeiten des Erhitzungsmikroskops. Berg- und Hüttenmänn. Monatshefte 105 (1960) S. 165–175, 201–210, 337–346.
[693] *Guthmann, K.:* Toleranzen und Fehler bei der Temperaturmessung mit Thermoelementen. Arch. Eisenhüttenwes. 25 (1954) S. 535–561.
[694] *Gutt, W.:* Some applications of high-temperature microscopy. Silicates Industr. 27 (1962) S. 285–296.

[695] *Halle, W.:* Ein einfacher Heiztisch für L-Mikroskope. Z. med. Labortechnik 1 (1960) S. 61–63.
[696] – *Ristau, O.:* Heiz- und Kühlsystem für mikroskopische Präparathalter. Patentschrift, Nr. 51459 der DDR, Kl. 42h 15/03; 5. 11. 66.
[697] *Hasson, R.:* The production of a film on the corrosion of extra-mild steel by uranium-hexafluoride. Microscope 15 (1967) S. 301–308.
[698] *Henning, F.:* Temperaturmessung. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1955.
[699] *Heymer, A.; Niegel, H.; Schneider, W.:* Vorrichtung zur mikroskopischen Untersuchung unter hohem Druck bei tiefen Temperaturen. Wirtschaftspatent der DDR Nr. 51714, Kl. 42h 15/03; 5. 12. 66.
[700] *Hoffmann, M.; Maier, R.G.:* Untersuchung der Rekristallisation von Gasphasen-Nb_3Sn mit dem Hochtemperaturmikroskop. Praktische Metallographie 2 (1965) S. 31–34.
[701] *Hofmann, E.E.:* Untersuchungen an feuerfesten Stoffen im Erhitzungsmikroskop und Vergleich der Ergebnisse mit denen der genormten Druckfeuerbeständigkeitsprüfung. Techn. Mitt. 57 (1964) S. 205–210.
[702] *Hooß, E.:* Ein thermoelektrisches Gerät zur Kühlung und Heizung von $-3 \ldots +50$°C für Durchströmungstische. Mikroskopie 18 (1963) S. 269–272.
[703] *Hunt, J.D.; Jackson, K.A.; Brown, H.:* Temperature gradient microscope stage suitable for freezing materials with melting points between -100 and $+200$°C. Rev. Scient. Instr. 37 (1966) S. 805.
[704] *Ishii, H.; Yokobori, T.:* On high temperature intercrystalline creep fracture. J. Phys. Soc. Japan 21 (1966) S. 822 u. 823.
[705] *Jahnel, J.:* Einfache elektrische Heizvorrichtung für die mikroskopische Untersuchung von Samenproben. Wiener Tierärztl. Mschr. 35 (1948) S. 301–303.
[706] *Jeglitsch, F.:* Körner und Korngrenzen im Hochtemperaturmikroskop. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 679–685.
[707] – Beitrag zum Oberflächenschmelzen und -erstarren. Praktische Metallographie 4 (1967) S. 53–64.
[708] *Joebstl, J.A.; Dix, S.:* The investigation of metastable crystals by means of high-pressure microscopy. Proc. Roy. Micr. Soc. 1 (1966) S. 111.
[709] *Jörg, F.:* Die Schmelzpunktbestimmung von Chemiefaserstoffen – eine methodische Ergänzung zur Faseranalyse. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. IV (1967) S. 13–18.
[710] *Kasen, M.B.; Ford, P.W.; Taggart, R.; Polonis, D.H.:* Elevated temperature metallographic facility for deformation and fracture studies. Rev. Scient. Instr. 36 (1965) S. 838–842.
[711] *Kirchner, R.L.; Ripling, E.J.:* Tensile hot stage for metallographic examination. Rev. Scient. Instr. 36 (1965) S. 1599–1602.
[712] *Kofler, L.; Kofler, A.:* Thermo-Mikromethoden. Innsbruck: Universitätsverlag Wagner 1954.
[713] *Kolenko, E.A.:* Microscope stage with temperature maintaining means. USA-Patent Nr. 3297491; 10. 1. 1967.
[714] *Kossel, D.; Anschütz, R.:* Der Leitz-Mikroskop-Heiztisch 1750 und seine Anwendung. Leitz-Mitt. Wiss. Techn. II (1963) S. 129.
[715] *Kretzmann, R.:* Handb. d. industriellen Elektronik. Berlin-Borsigwalde: Verlag f. Radio-Foto-Kinotechnik GmbH 1954.
[716] *Kröger, C.:* Kältekammer für mikroskopische Untersuchungen. Patentschrift Nr. 977 der DDR, Kl. 42h 15/03; 28. 5. 1954.
[717] *Kuhnert-Brandstaetter, M.; Müller, L.:* Experience in hot-stage microscopy of inorganic compounds. Microscope 16 (1968) S. 257–265.
[718] *Kulmburg, A.:* Über die direkte Bestimmung der Korngröße mit dem Hochtemperaturmikroskop. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 685–694.
[719] – *Blöch, R.:* Untersuchungen über das Aufschmelzverhalten von Schnellarbeitsstählen mit Hilfe des Hochtemperaturmikroskops. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 699 bis 704.
[720] – *Gabler, F.; Korntheuer, F.:* Zusatzeinrichtungen für die Hochtemperaturmikroskopie und praktische Anwendung. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 723–726.
[721] – *Swoboda, K.:* Beitrag zur Messung der Probentemperatur in der Hochtemperaturmikroskopie. Arch. Eisenhüttenwes. 37 (1966) S. 173–179.
[722] – Untersuchungen über das Umwandlungsverhalten legierter Stähle mit dem Hochtemperaturmikroskop. Radex-Rdsch. (1967) H. 3/4, S. 811-818.
[723] *Lindorf, H.:* Technische Temperaturmessung. Essen: W. Girardet 1956.
[724] *Лозинский, М.Г.:* Высокотемпературная металлография. Москва: Машгиз 1956. Übers. ins Englische: High temperature metallography. New York, Oxford, London, Paris: Pergamon Press 1961.
[725] *Losinski, M.G.:* High-temperature metallography. J. Roy. Micr. Soc. 8619 (1967) S. 213.
[726] *Лозинский, М.Г.; Миротворский, В.С.:* Некоторые закономерности изменения микротвердости технического железа при нагреве в широком интервале температур и растяжении в вакууме. Изв. АН СССР, Н 3, Металлургия и топливо, 1959, 52 ... 61.
[727] – *Перцовский, Н.С.:* Установка типа имаш –56–65. Описаник и инструкция по эксплуатации. Москва, ОНТИ 1966.
[728] –; *Скворцов, Г.Е.; Антипова, Е.И.; Ковнер, И.И.:* Тенденции развития высокотемпературного микростоения для исследования структур и материалов в диапазоне температур 2000 ... 3000 °С. Оптико-механическая промышленность 1967-май, 32-40.

[729] *Losinski, M.G.; Tananov, A.I.:* Gefügeentwicklung von doppelplattierten Stählen im Hochtemperaturmikroskop. Praktische Metallographie 6 (1969) S.3–15.

[730] *Malissa, H.:* Über das Verhalten von isolierten Einschlüssen aus Eisenwerkstoffen bei hohen Temperaturen. Talanta 3 (1959) S.97–102.

[731] *McCrone, W.C.:* Fusion methods in chemical microscopy. New York: Interscience Publishers 1957.

[732] *Miller, R.P.; Sommer, G.:* A hot-stage microscope incorporating a differential thermal analysis unit. J. Scient. Instr. 43 (1966) S.293–297.

[733] *Mitsche, R.; Gabler, F.; Jeglitsch, F.:* Die Direktbeobachtung von Umwandlungsvorgängen in Festkörpern. Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd.III, Teil 2, S.269–309. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1969.

[734] –, –, – *Burkert, D.G.:* Hochfrequenzkinematographie von Martensitumwandlungen. Radex-Rdsch. (1967) H.3/4, S.705–710.

[735] – *Trojer, F.:* Hochtemperaturmikroskopie in der Keramik. Radex-Rdsch. (1960) H.6, S.400–405.

[736] *Nacken, R.:* Vergleich der optischen und thermischen Methode zur Bestimmung von Schmelztemperaturen. Zentralbl. f. Mineralogie (1913) S. 328–337.

[737] *Naumann, F.K.:* Die zeitliche Verfolgung der Nitridbildung an der Oberfläche von Eisen im Heiztischmikroskop. Praktische Metallographie 5 (1968) S.473–485.

[738] *Neupert, M.:* Erhitzungsmikroskop auf optischer Bank. Jenaer Rdsch. 8 (1963) S.99–104.

[739] – Vakuumkammer mit einer Heizeinrichtung für Mikroskope, insbesondere für Auflichtmikroskope. Wirtschaftspatent der DDR, Nr. 53889, Kl. 42h 15/03; 5.2.1967.

[740] – *Seyfarth, H.-H.; Herrling, R.; Hahne, B.:* Der Heiz- und Kühltisch −20...+80°C und seine Anwendung. Jenaer Rdsch. 17 (1972), H.2, S.75 bis 83.

[741] *Novak, J.:* Wärme- und Feuchtigkeitsgehäuse für Mikroskope. Mikroskopie 21 (1966) S.65 bis 69.

[742] *Olson, D.M.; Brixner, B.B.; Smith, M.C.:* A microscope for ultrahigh temperatures. Metal Progress 81 (1962) S.75–79.

[743] *Opfer-Schaum, R.:* Mikroskop-Heiz- und Kühltische nebst Hilfsgeräten. Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd. I, Teil 1, S.481–519. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1957.

[744] *Otto, L.:* Der Mikromanipulator und seine Hilfsgeräte. Berlin: VEB Verlag Technik 1954.

[745] *Radmacher, W.:* Bestimmung des Asche-Schmelzverhaltens fester Brennstoffe. Brennstoff-Chemie 30 (1949) S.377–384.

[746] *Rasch, R.:* Beitrag zur Durchführung von Messungen im Erhitzungsmikroskop. Glas-Email-Keramo-Techn. 8 (1957) S.212–214

[747] *Reinacher, G.:* Studium der Gefügedeformation von Platinwerkstoffen bei Mikrozeitstandversuchen in einem Spezialmikroskop. Z. f. Metallkunde 51 (1960) S.18–24.

[748] – Heizbare Objekttische für die Metallmikroskopie. Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd.I, Teil 2, S.385–441. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1960.

[749] – Heizmikroskope zur Beobachtung von Gefügedeformationen unter dem Einfluß mechanischer Belastungen. Handb. d. Mikroskopie i. d. Technik. Bd.III, Teil 2, S.313–346. Frankfurt (Main): Umschau-Verlag 1969.

[750] Entwicklung und Ergebnisse der Hochtemperatur-Metallmikroskopie. Z. f. Metallkunde 45 (1954) S.453–458.

[751] *Rothe, W.:* Ein neues Zähigkeitstemperaturmeßgerät für Glas mit optischer Registrierung. Silikattechnik 5 (1954) S.296–299.

[752] *Ryš, P.; Bezděk, L.; Ciha, K.; Růžička, D.; Škarek, J.:* Untersuchung von Metallgefügen bei hohen und niedrigen Temperaturen. Acta Technika (1958) H.1, S.58–83; H.2, S.85–120.

[753] *Sagel, K.:* Die thermoelektrische Kälteerzeugung mit Halbleiter-Thermoelementen. Umschau 62 (1962) S.345–347, 370–372.

[754] *Schmidt, K.H.; Höss, R.:* Ein Hochtemperaturmikroskop für große Blechproben und seine Anwendung auf einige Fragen des Kornwachstums. Arch. Eisenhüttenwes. 34 (1963) S.831 bis 837.

[755] *Schor, S.:* Untersuchung des Blähverhaltens von Kohlen im Aschenschmelzmikroskop. Energie 8 (1956) S.7–9.

[756] *Sims, A.L.:* Warm plate for the microscopic observation of living cells. J. Scient. Instr. 39 (1962) S.160 u. 161.

[757] *Starka, J.:* Physiologie und Biochemie der Mikroorganismen. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1968.

[758] *Stecker, K.:* Thermoelektrische Kühlung. radio und fernsehen 13 (1964) S.455–457, 494, 499–501.

[759] *Suter, H.; Scheidegger, R.:* Der Mettler FP 2: Ein neues Instrument für thermo-mikroskopische Untersuchungen. Druckschrift der Firma Mettler, Greifensee-Zürich.

[760] *Toaka, T.; Ohkohchi, M.:* Improved high-temperature microscope and its metallurgical applications. Jap. J. appl. Phys. 2 (1963) S.354–363.

[761] TGL 0-1953: Temperaturmessungen bei Abnahmeversuchen und in der Betriebsüberwachung (Temperaturmeßregeln).

[762] TGL 14485: Prüfung fester Brennstoffe. Bestimmung des Asche-Schmelzverhaltens.

[763] TGL 18882: Prüfung keramischer Roh- und Werkstoffe. Bestimmung des thermischen Verhaltens mit dem Hochtemperaturmikroskop.

[764] TGL 0-43710: Thermospannungen und Werkstoffe der Thermopaare.

[765] TGL 0-43712: Thermodrähte für Thermoelemente.

[766] TGL 0-43713: Ausgleichs-Drähte, Ausgleichs-Litzen.
[767] *Thorsen, K.A.:* Heizkammer zur Untersuchung der Warmrißbildung in Schweißnähten. Praktische Metallographie 4 (1967) S.443–457.
[768] *Torkar, K.; Weitzer, H.H.:* Die Verwendung eines Mikroskop-Heiztisches in der Pulvermetallurgie. Z.f. Metallkunde 55 (1964) S.142 bis 145.
[769] *Vaughan, H.P.:* Photometric recording of single crystal melting values and other fusion phenomena. Microscope 17 (1969) S.71–76.
[770] *Vidai, A.:* Erforschung und kinematographische Untersuchung der Primärreaktionen der Gemengebestandteile im Hochtemperaturmikroskop. Glastechn. Berichte 36 (1963) S.305 bis 323.
[771] *Wiesinger, H.D.:* Eine neue, einfache Einrichtung für Hochtemperaturmikroskopie und Erfahrungen mit dieser Untersuchungsmethode. Praktische Metallographie 2 (1965) S.9–17.
[772] *Yokobori, T.; Ishii, H.; Fujimura, Y.:* High temperature creep studies on austenitic stainless steels in vacuum. Tohoku University Sendai Japan, Vol. 2, Nr.1, August 1966, S.1–19.

Literatur zu Abschnitt 11.

[773] *Cox, M.E.:* Holographic Microscopy – A Reassessment. Microscope 22 (1974) S.361.
[774] *Gabor, D.:* A New Microscopic Principle. Nature 161 (1948) S.777.
[775] *Thompson, B.J.:* Particle Size Examination. Vortragsreferat, Symposium on the Engineering Uses of Holography, Glasgow 1968.

Namenverzeichnis

Sachwörterverzeichnis

Die Zeitschrift

FEINGERÄTETECHNIK

erscheint im VEB Verlag Technik und wird von der Wissenschaftlich-technischen Gesellschaft für Meß- und Automatisierungstechnik in der KDT herausgegeben. Als wissenschaftlich-technisches Publikationsorgan behandelt die „Feingerätetechnik" Fragen der Entwicklung, Fertigung und Anwendung von Feingeräten, d. h. von Erzeugnissen des feinmechanisch-optisch-elektronischen Gerätebaus.
In Fachbeiträgen werden die neuesten Geräte vorgestellt und Beispiele für deren Anwendung in der Produktion und in der Forschung gebracht. In Übersichtsbeiträgen werden die Entwicklungstendenzen des Fachgebiets dargelegt, während zu speziellen Themen nur Informationsartikel (Kurzbeiträge) veröffentlicht werden. Besonderer Wert wird auf den Umschauteil gelegt (Tagungs- und Messeberichte, technische und ökonomische Informationen, Buchbesprechungen und Literaturankündigungen, Hinweise usw.).
Der Leserkreis setzt sich aus Wissenschaftlern und Ingenieuren aller Fachgebiete zusammen, in denen Feingeräte produziert oder angewendet werden. Neben Technologen, Meßtechnikern und Gütekontrolleuren aller Industriezweige werden insbesondere Konstrukteure, Wissenschaftler, Hoch- und Fachschüler der Fachrichtungen Optik, Gerätetechnik, Meß- und Regelungstechnik angesprochen.
Die Zeitschrift „Feingerätetechnik" erscheint monatlich mit 48 Textseiten und 4 Umschlagseiten; EVP 3,00 Mark.